

**Substratspezifität und Funktionalität  
von Epimerisierungsdomänen in der  
nichtribosomalen Peptidsynthese**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Daniel Björn Stein**  
aus Berlin-Charlottenburg

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 19.09.2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel  
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Geyer

Tag der Disputation: 12.10.2006

Weite Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen erschienen:

Major parts of the work presented here have been published:

**Stein, D. B., Linne, U., & Marahiel, M. A.** (2005) Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases, *FEBS J.* **272**, 4506–4520

**Stein, D. B., Linne, U., Hahn, M. & Marahiel, M. A.** (2006) Impact of epimerization domains on the intermodular transfer of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide synthesis, *ChemBioChem*, in press

Weitere Publikationen:

Other publications:

**Linne, U., Stein, D. B., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (2003) Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template. *Biochemistry* **42**, 5114–5124



## Zusammenfassung

Naturstoffe mit einem außerordentlich breiten Spektrum an Strukturen und pharmakologischen Bedeutungen werden fließbandartig an multimodular aufgebauten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) assembliert. Jedes Modul dieser Megaenzyme umfasst dabei eine Anzahl von katalytisch eigenständigen Domänen, deren spezifische Interaktion den Einbau und die Modifikation eines Bausteins sichert. Sehr häufig enthalten die Produkte D-Aminosäuren, die zum Großteil durch modulintegrierte Epimerisierungs- (E-) Domänen aus den entsprechenden über einen Thioester *peptidyl carrier protein* (PCP) gebundenen L-Intermediaten in einer Gleichgewichtsreaktion erzeugt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein chemoenzymatischer Ansatz zur quantitativen Untersuchung der nativen Substratspezifität von vier unterschiedlichen Synthetasen entstammenden E-Domänen entwickelt. Dazu wurden entsprechende PCP-E-Domänen auf genetischer Ebene isoliert. Zwei dieser Konstrukte (TycB<sub>3</sub>- und FenD<sub>2</sub>-PCP-E) entstammten Elongationsmodulen und enthielten sogenannte Peptidyl-E-Domänen, während die beiden anderen (TycA- und GrsA-PCP-E) Initiationsmodulen entnommen wurden und entsprechend Aminoacyl-E-Domänen trugen. Die Apo-Proteine wurden überproduziert und unter Verwendung der promiskuitiven 4'-Phosphopantethein- (Ppant-) Transferase Sfp mit einer Auswahl synthetisierter Peptidyl-CoAs fehlmodifiziert. Enzymgebundene Peptidyl-S-Ppant Reaktionsprodukte der darauffolgenden, durch die E-Domänen katalysierten Stereoinversion wurden chemisch abgespalten und auf ihr L zu D-Verhältnis untersucht. Wie anhand von jeweils berechneten  $k_{\text{obs}}$ -Werten und vorgefundenen L/D-Endgleichgewichten evaluiert wurde, tolerieren alle vier getesteten E-Domänen eine Vielfalt von Peptidyl-S-Ppant-Substraten. Es zeigte sich, dass kein Zusammenhang zwischen der Spezifität (aktivierter Aminosäure) eines Moduls und der Toleranz der ihm entstammenden E-Domäne existiert. Veränderungen am N-terminalen Ende des Substrats können dabei gleiche Auswirkungen auf die Epimerisierungsaktivität haben wie Variationen des C-Terminus (der Thioester gebundenen Aminosäure). Die E-Domänen invertierten N-methylierte Substrate besonders effizient. Hervorzuheben ist die entdeckte Fähigkeit von Aminoacyl-E-Domänen zur Epimerisierung von Peptidyl-Substraten. Außerdem konnte deutlich gemacht werden, dass die Kondensations (C-) Domäne von TycB<sub>1</sub> ebenso in der Lage ist, Peptidyl-Substrate von TycA zu empfangen und zu prozessieren.

Da E-Domänen in vielen Systemen am C-Terminus einer Synthetase stehen, wurde angenommen, dass sie in dieser Position an der gezielten Interaktion mit dem nachfolgenden Enzym und dem geregelten Transfer von Intermediaten beteiligt sind. Deshalb setzte sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit mit der Beleuchtung dieser funktionellen Rolle auseinander. Es wurden dimodulare Derivate aus der Tyrocidin-Synthetase B auf genetischer Ebene konstruiert und die überproduzierten rekombinanten Proteine charakterisiert. Zunächst wurde eine optimierte Abfolge aus tryptischer Proteolyse und hochauflösender Massenspektrometrie eingesetzt, um die Bildung von Intermediaten am TycB<sub>3</sub>-PCP des TycB<sub>2-3</sub>-Wildtyps und des E-Domänen-Austauschproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> direkt zu verfolgen. Der E-Domänen-Austausch beeinträchtigte die Dipeptid- (Phe-Phe-) Bildung signifikant. Ferner wurden die beiden genannten Enzyme und ein weiteres, bei dem die Kommunikation vermittelnde (COM-) Domäne gegen die entsprechende von TycA ausgetauscht worden war, mit dem Akzeptor TycB<sub>1</sub> getestet. Funktionelle Unterschiede zwischen Peptidyl- und Aminoacyl-E-Domänen im Kontext der *in trans* Interaktion wurden hierbei deutlich. Peptidyl-E-Domänen scheinen für die Regulation von Kondensation, Epimerisierung und Transfer von Zwischenstufen zum *downstream* Modul optimiert zu sein, während Aminoacyl-E-Domänen die *upstream* Kondensation beeinträchtigen und Misinitiation hervorrufen. Diese Erkenntnisse werden für die erfolgreiche Gestaltung neuer Wirkstoffe per Biokombinatorik mit NRPS unter Einbeziehung von E-Domänen von Bedeutung sein.

## Summary

A broad variety of structurally diverse and pharmacologically relevant natural compounds is synthesized by multimodular nonribosomal peptide synthetase (NRPS) assembly lines. Each module within these megaenzyme systems comprises a number of domains that have distinct catalytic functions and interact specifically to ensure the incorporation and modification of one building block. In many cases the products contain D-amino acids, the majority of which is generated in an equilibrium-forming reaction by module integrated epimerization (E) domains from the corresponding peptidyl carrier protein- (PCP-) bound L-intermediates.

Within the scope of this work a chemoenzymatic approach was developed in order to investigate the native substrate specificity of four E domains derived from different synthetases. For this purpose, corresponding PCP-E bidomains were isolated at gene level. Two of these constructs (TycB<sub>3</sub>- and FenD<sub>2</sub>-PCP-E) originated from elongation modules containing so-called peptidyl-E domains, while the two other (TycA- and GrsA-PCP-E) were derived from initiation modules accordingly including aminoacyl-E domains. The recombinant apo-proteins were overproduced and modified with a selection of peptidyl-CoAs utilizing the promiscuous 4'-phosphopantetheine- (Ppant-) transferase Sfp. Enzyme-bound peptidyl-S-Ppant reaction products of the subsequently occurring stereoinversion catalyzed by the E domains were cleaved chemically and analyzed for their L to D-ratio. Individually calculated  $k_{\text{obs}}$  values and final L/D-equilibria observed for each reaction showed that all four E domains tolerate various peptidyl-S-Ppant. Apparently, the substrate tolerance of an E domain does not correlate with the specificity of the module (activated amino acid) it originates from. The epimerization efficiency can equally be affected by alterations of the substrate at the C-terminus (directly thioester-bound amino acid) and the N-terminal part. All tested E domains converted *N*-methylated substrates with great activity. The most interesting observation was the ability of aminoacyl-E domains to epimerize peptidyl-substrates. Additionally, it could be demonstrated that the condensation (C) domain of TycB<sub>1</sub> is able to elongate peptidyl-substrates transferred from TycA.

In several systems the C-termini of synthetases harbor E domains, which in these cases seem to facilitate the ordered interaction with the following enzyme and the directed transfer of intermediates. Therefore, the second part of the work presented here aimed at elucidating this additional functional role. Bimodular derivatives of the tyrocidine synthetase B were constructed at gene level and the overproduced recombinant proteins were characterized. Initially, sequent tryptic proteolysis and high-resolution mass spectrometry were optimized for the direct interrogation of intermediates attached to the TycB<sub>3</sub>-PCP domain of the wild-type TycB<sub>2-3</sub> and the E domain exchange protein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub>. The E domain exchange significantly affected dipeptide- (Phe-Phe-) formation. In addition, the two mentioned proteins and a version of TycB<sub>2-3</sub> fused to the communication-mediating (COM) domain of TycA were applied in product formation assays with the acceptor TycB<sub>1</sub> to corroborate E domain impact on intermodular NRPS action. Significant functional differences in terms of *in trans* interaction and misinitiation were observed between the two types of C-terminal E domains. Peptidyl-E domains seem to be optimized for regulating the progression of peptide bond formation, epimerization, and intermediate transfer to the downstream module, whereas aminoacyl-E domains impair upstream condensation and cause misinitiation. These perceptions will be of fundamental importance for the successful generation of novel bioactive compounds by biocombinatorial rearrangements of NRPSs involving E domains.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1 Struktur und Aktivität nichtribosomal synthetisierter Peptide .....	5
2.2 Die nichtribosomale Peptidsynthese .....	8
2.3 Domänenstruktur von NRPS-Modulen .....	9
2.3.1 Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) .....	10
2.3.2 Die Thiolierungsdomäne (T-Domäne) oder PCP ( <i>Peptidyl Carrier Protein</i> ).....	11
2.3.2.1 Posttranslationale Modifikation von T-Domänen .....	13
2.3.3 Die Kondensationsdomäne (C-Domäne) .....	14
2.3.4 Die Thioesterasedomäne (Te-Domäne) .....	16
2.3.5 Die Typ II-Thioesterase (TeII) .....	17
2.3.6 Optionale modifizierende Domänen .....	18
2.3.6.1 Die Epimerisierungsdomäne (E-Domäne) .....	18
2.3.6.2 Die duale Kondensations-/Epimerisierungsdomäne (C/E-Domäne).....	20
2.3.6.3 Die Zyklisierungsdomäne (Cy-Domäne) .....	20
2.3.6.4 Die Oxidationsdomäne (Ox-Domäne) .....	21
2.3.6.5 Die N-Methylierungsdomäne (M-Domäne) .....	21
2.3.6.6 Die N-Formylierungsdomäne (F-Domäne) .....	22
2.3.6.7 Die Reduktasedomäne (R-Domäne).....	22
2.3.7 Weitere Modifikationen .....	22
2.4 Protein-Protein Interaktion .....	23
2.4.1 Das Minimalsystem TycA/TycB <sub>1</sub> .....	24
2.5 Die Biosynthese von D-Aminosäuren .....	25
2.6 D-Aminosäuren in nichtribosomal synthetisierten Peptiden .....	28
2.7 Aufgabenstellung .....	29
<b>3 Material .....</b>	<b>31</b>
3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial .....	31
3.2 Geräte .....	32
3.3 Vektoren .....	33
3.3.1 pQE60 und pQE70 .....	33
3.3.2 pREP4.....	34

3.4 Mikroorganismen .....	35
3.4.1 <i>E. coli</i> XL1-Blue .....	35
3.4.2 <i>E. coli</i> XL10-Gold .....	35
3.4.3 <i>E. coli</i> M15 .....	36
3.4.4 <i>E. coli</i> SG13009 .....	36
3.5 Medien .....	36
<b>4 Methoden.....</b>	<b>38</b>
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	38
4.1.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide .....	38
4.1.1.1 Plasmide zur Expression der PCP-E-Didomänen .....	39
4.1.1.2 Plasmide zur Expression der dimodularen TycB <sub>2-3</sub> -Derivate .....	39
4.1.1.3 Weitere Plasmide.....	40
4.1.2 DNA-Sequenzierung .....	40
4.2 Proteinchemische Methoden .....	40
4.2.1 Genexpression im pQE-Vektor-System .....	41
4.2.2 Zellaufschluss.....	42
4.2.3 Proteinreinigung per IMAC-Affinitätschromatographie.....	42
4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	43
4.3 Chemische Methoden .....	44
4.3.1 Festphasen-Synthese von Peptiden (SPPS).....	44
4.3.1.1 Initiation: Beladung der Matrix.....	45
4.3.1.2 Elongation: Verknüpfung von Fmoc-Aminosäuren zu Peptiden .....	46
4.3.1.3 Termination: Freisetzen des synthetisierten Peptids von der Matrix .....	47
4.3.2 Synthese von CoA-Derivaten.....	48
4.3.2.1 Synthese von Peptidyl-CoAs.....	48
4.3.2.2 Synthese von Fluorescein-CoA .....	50
4.4 Biochemische Methoden .....	51
4.4.1 Modifikation der Enzyme mit CoASH oder CoA-Derivaten und Sfp .....	51
4.4.2 Experimente mit den PCP-E-Didomänen .....	51
4.4.2.1 Epimerisierungsassay .....	51
4.4.2.2 Assay für die Elongation von Peptidyl-Substraten durch TycB <sub>1</sub> -C .....	52
4.4.3 Experimente mit den dimodularen TycB <sub>2-3</sub> -Derivaten.....	53
4.4.3.1 Identifizierung von tryptischen TycB <sub>3</sub> -PCP-Fragmenten mit aktivem Serin... 53	
4.4.3.2 Assay für die Verfolgung der Phe-Phe-S-Ppant-Bildung.....	54



4.4.3.3 Produktbildungsassay mit TycB <sub>1</sub> .....	54
4.5 Analytische Methoden.....	55
4.5.1 Massenspektrometrie.....	55
4.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie .....	55
4.5.2.1 HPLC-MS-Analytik der Epimerisierungsprodukte.....	55
4.5.2.2 HPLC-MS-Analytik nach Produktbildungsassays .....	56
4.5.2.3 HPLC-Analyse und Fraktionierung nach tryptischem Verdau .....	57
4.5.2.4 HPLC-MS-Analyse der tryptischen Fragmente .....	57
4.5.2.5 HPLC-MS <sup>2</sup> -Methode zur Verfolgung der Phe-Phe- <i>S</i> -Ppant-Bildung.....	57
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
5.1 Chemoenzymatische Charakterisierung der Substratspezifität von E-Domänen.....	59
5.1.1 Erzeugung und Aufreinigung der rekombinanten PCP-E-Domänen .....	60
5.1.2 Entwicklung des Epimerisierungsassays.....	62
5.1.3 Wahl der Peptidyl-CoAs .....	64
5.1.4 Epimerisierungsaktivität von TycB <sub>3</sub> - und FenD <sub>2</sub> -PCP-E.....	66
5.1.5 Epimerisierungsaktivität von TycA- und GrsA-PCP-E .....	70
5.1.6 Epimerisierungsaktivität mit <i>N</i> -methylierten Substraten .....	72
5.2 Elongation von Peptidyl-Substraten durch die TycB <sub>1</sub> -C-Domäne.....	73
5.3 Funktionelle Charakterisierung von E-Domänen.....	76
5.3.1 Nomenklatur der rekombinanten dimodularen Proteine .....	77
5.3.2 Erzeugung und Aufreinigung der rekombinanten dimodularen Proteine .....	77
5.3.3 Markierung und Identifizierung tryptischer TycB <sub>3</sub> -PCP-Fragmente mit aktivem Serin .....	78
5.3.4 Direkte Bestimmung der Phe-Phe- <i>S</i> -Ppant-Bildungsaktivität .....	84
5.3.5 Produktbildung in Interaktion mit TycB <sub>1</sub> .....	85
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>89</b>
6.1 E-Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese.....	90
6.2 Substratspezifität von E-Domänen.....	91
6.2.1 Chemoenzymatische Modifikation von PCP-E-Domänen.....	91
6.2.2 Auswahl der enzymatischen Systeme und Design der Substrate.....	93
6.2.3 Epimerisierungsaktivität mit variierenden Substraten .....	94
6.2.3.1 Selektivität der Peptidyl-E-Domänen.....	95
6.2.3.2 Selektivität der Aminoacyl-E-Domänen .....	96

---

6.2.3.3 Toleranz von E-Domänen gegenüber <i>N</i> -methylierten Substraten.....	98
6.2.4 Erkennung und Einfluss der Substrate .....	99
6.2.5 Aktivitätsvergleich Aminoacyl- versus Peptidyl-E-Domänen.....	100
6.3 Substratspezifität der TycB <sub>1</sub> -C-Domäne.....	101
6.4 Funktionalität von E-Domänen .....	102
6.4.1 Das dimodulare Modellsystem.....	103
6.4.2 Massenspektrometrische Bestimmung der Dipeptidbildungsaktivität.....	104
6.4.3 Einfluss der E-Domäne auf die Elongation.....	106
6.4.4 Einfluss der E-Domäne auf den Transfer von Reaktionsintermediaten.....	106
6.4.5 Funtionalitätsvergleich Aminoacyl- versus Peptidyl-E-Domänen.....	108
6.5 Biokombinatorik mit NRPS unter Beteiligung von E-Domänen .....	110
<b>7 Anhang .....</b>	<b>113</b>
7.1 Konservierte <i>core</i> -Motive von NRPS-Domänen .....	113
<b>8 Literatur.....</b>	<b>115</b>

# 1 Abkürzungen und Symbole

**Tabelle 1-1** Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
ACV	$\delta$ -( $\alpha$ -Aminoadipyl)-cysteinyl-D-valin
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
Aminoacyl-S-PCP/	Die an der Sulfhydryl-Gruppe des über den konservierten Serin-rest
Aminoacyl-S-T-Domäne	gebundenen Kofaktors Ppant aminoacylierte T-Domäne
Aminoacyl-S-Ppant	Aminoacyl-Derivat des Kofaktors Ppant
Amp <sup>n</sup>	Ampicillin (Endkonzentration n in $\mu\text{g/ml}$ )
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	Stammsammlung ( <i>American Type Culture Collection</i> )
<i>bla</i>	$\beta$ -Lactamase-Gen
bp	Basenpaar(e)
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acyltransferase-Gen
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoASH	Coenzym A
COM-Domäne	Kommunikationsvermittelnde-Domäne ( <i>communication-mediating domain</i> )
Cy-Domäne	Zyklisierungsdomäne
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DKP	D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (wenn nicht anders deklariert)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EV	Endvolumen
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie ( <i>fast protein liquid chromatography</i> )
FT	Fourier-Transform
h	Stunde(n)

HBTU	2-[1- <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
ICR	Ionen-Zyklotron-Resonanz ( <i>ion cyclotron resonance</i> )
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie ( <i>immobilized metal ion ligand affinity chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
Kan <sup>n</sup>	Kanamycin (Endkonzentration n in $\mu\text{g/ml}$ )
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
M	molar (mol/l)
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCS	Multipler Klonierungsbereich ( <i>multiple cloning site</i> )
M-Domäne	<i>N</i> -Methylierungsdomäne
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )
ms	Millisekunde(n)
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nM	nanomolar (nmol/l)
nmol	Nanomol
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetasen
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD <sub><math>\lambda</math></sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda$ in nm
<i>ori</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
Ox-Domäne	Oxidationsdomäne
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pant	Pantethein

---

PCP	<i>peptidyl carrier protein</i> (entspricht T-Domäne)
PCP <sup>C</sup>	C-terminal mit einer C-Domäne verknüpftes PCP
PCP <sup>E</sup>	C-terminal mit einer E-Domäne verknüpftes PCP
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Peptidyl-S-PCP/	T-Domäne mit dem am konservierten Serinrest gebundenen Kofaktor
Peptidyl-S-T-Domäne	Ppant, der einen Peptidylrest als Thioester über seine Sulfhydrylgruppe trägt
P <sub>i</sub>	anorganisches Orthophosphat
PKS	Polyketidsynthase(n)
PLP	Pyridoxalphosphat
pM	pikomolar (pmol/l)
pmol	Pikomol
Ppant	der Kofaktor 4'-Phosphopantethein
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RBS	ribosomale Bindestelle
R-Domäne	Reduktasedomäne
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Sfp	die mit dem Surfactin Biosynthese-Operon aus <i>Bacillus subtilis</i> assoziierte Ppant-Transferase
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCA	Trichloressigsäure
T-Domäne	Thiolierungsdomäne (entspricht PCP)
Te-Domäne	Thioesterasedomäne
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	<i>time of flight</i>
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

---

**Tabelle 1-2** Aminosäuren, ihre Abkürzungen und Molekulargewichte

Aminosäure	3- Buchstabencode	1- Buchstabencode	MW [g mol <sup>-1</sup> ]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Asn oder Asp	Asx	B	–
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glu oder Gln	Glx	Z	–
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

## 2 Einleitung

Eine Reihe von Naturstoffen, die meist aus Mikroorganismen isoliert werden, weisen unterschiedlichste Bioaktivitäten (z. B. antibiotische, immunsuppressive, cytostatische oder toxische) auf. Viele dieser Sekundär-Metabolite, die den Wirtsorganismen vermutlich als Signalmoleküle oder für die Abwehr von Nahrungskonkurrenten dienen [Hahn & Dubnau, 1991; Walsh, 2000] sind in der modernen Medizin als Therapeutika fest etabliert. Die Suche nach neuen bioaktiven Substanzen dauert jedoch an, speziell da der verbreitete Einsatz von Antibiotika nach der bahnbrechenden Entdeckung des Penicillins [Fleming, 1929] das in Krankenhäusern gehäufte Auftreten resistenter pathogener Erregerstämme zur Folge hatte [Gold & Moellering, 1996]. Zwar sind neue Varianten bekannter Moleküle durch semi- oder totalsynthetische Ansätze zugänglich, doch ist es auf diesem Weg kaum mehr möglich die Aktivitäten gezielt zu steigern oder zu verändern [Schmidt, 2004]. Alternative Routen hierfür können auf Basis der ständig wachsenden genetischen Information zu einer Vielzahl Naturstoff produzierender Organismen entwickelt werden. Oft werden in diesen Stämmen kleine, bioaktive Peptide über nichtribosomale Biosynthesewege an großen multimodularen Enzymen, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), erzeugt [Finking & Marahiel, 2004; Sieber & Marahiel, 2005]. Durch Dekodierung des Genoms entsprechender Wirtsorganismen können bislang unbekannte Vertreter dieser Enzymklasse und der entsprechend an ihnen hergestellten Naturstoffe identifiziert werden [Lautru *et al.*, 2005]. Neben einer weiteren chemischen Modifikation der Produkte bieten die Enzymsysteme selbst Möglichkeiten zur Manipulation, z. B. durch kombinatorische Ansätze oder gerichtete Evolution [Cane *et al.*, 1998], und legen somit ein beachtliches Potential zur Entwicklung neuer Wirkstoffe offen. D-Aminosäuren sind die häufigste strukturelle Besonderheit mit Relevanz für die Aktivität derartiger Peptide. Ihre enzymatische Erzeugung an NRPS ist mit Bezug auf den Nutzen in der Biokombinatorik der Fokus der vorliegenden Arbeit.

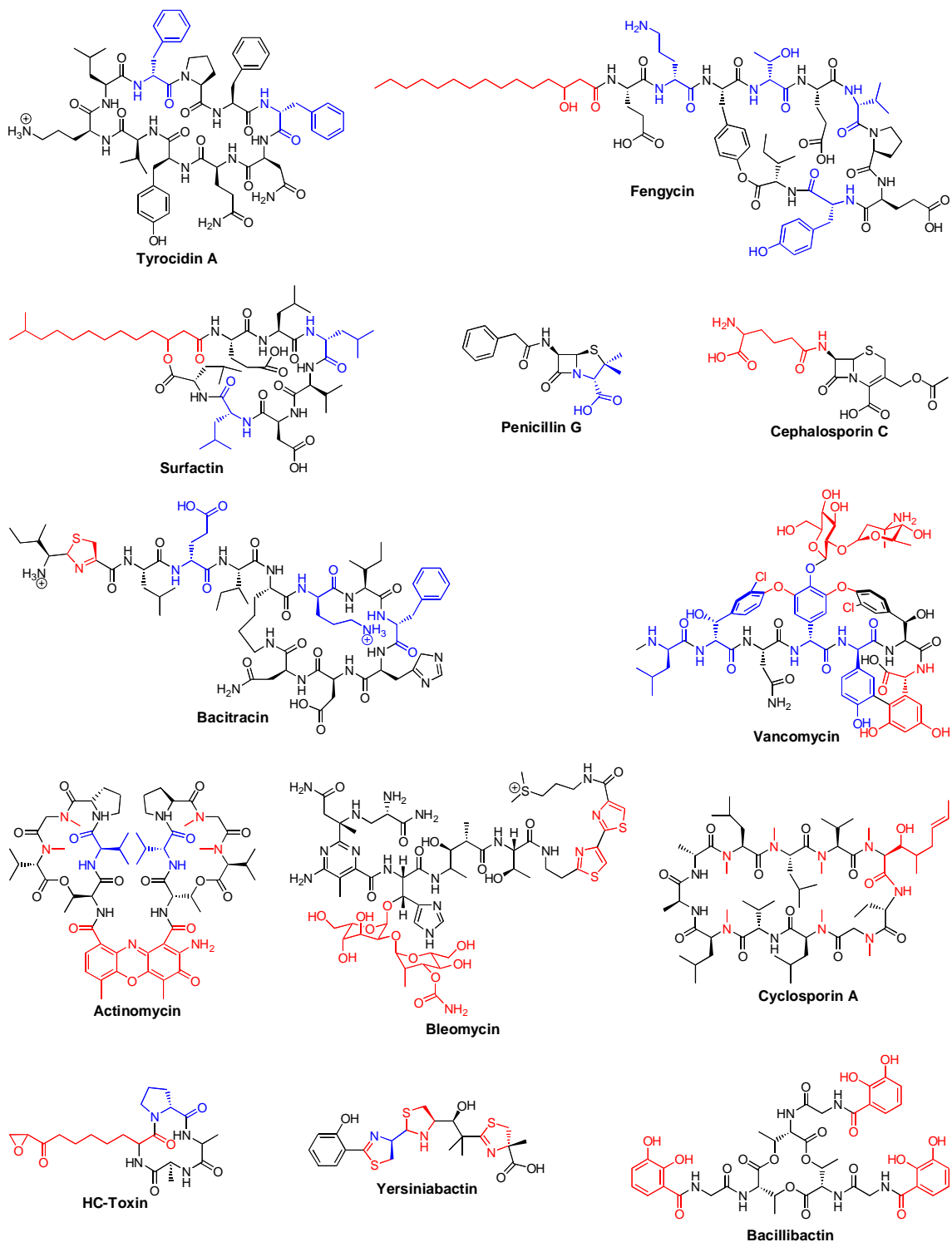
### 2.1 Struktur und Aktivität nichtribosomal synthetisierter Peptide

Nichtribosomal synthetisierte Peptide bilden eine Gruppe niedermolekularer und aus verschiedenen Gesichtspunkten pharmakologisch interessanter Verbindungen, die hauptsächlich in filamentösen Pilzen und Bakterien (hauptsächlich Mitglieder der Gram-positiven *Actinomyceten* und *Bacilli*) sowie marinen Mikroorganismen [Faulkner, 2002] produziert werden [Marahiel *et al.*, 1997; Walsh, 2002]. Gefunden werden hierbei lineare, meistens jedoch makrozyklische oder verzweigt zyklische Strukturen sowie Multimere.

Neben einem hohen Maß an ungewöhnlichen (nicht proteinogenen) Aminosäuren und Hydroxysäuren können diese Naturstoffe weitere interessante Modifikationen häufig durch C $\alpha$ -Epimerisierung (D-Aminosäuren), aber auch durch N-Formylierung, N-Methylierung, Acylierung, Heterocyklisierung, Halogenierung, Glycosylierung oder Reduktion sowie seltene Peptidverknüpfungen (über  $\beta$ -,  $\chi$ - und  $\delta$ -Positionen) enthalten [Konz & Marahiel, 1999; Walsh *et al.*, 2001]. Auf diese Weise wird eine enorme Vielfalt an Strukturen bereitgestellt und eine damit verbundene hohe Bandbreite an Aktivitäten erzeugt. Ausgewählte Beispiele für nichtribosomal synthetisierte Peptide und ihrer strukturellen Eigenheiten sind in Abbildung 2-1 dargestellt. Die prominentesten Vertreter mit antibiotischer Wirkung sind die Penicilline und Cephalosporine, deren Vorläufer – das Tripeptid ACV aus *Penicillium chrysogenum* – nichtribosomal hergestellt wird [Byford *et al.*, 1997] und eine  $\delta$ -verknüpfte L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure sowie ein D-Valin enthält. Weitere Beispiele für Antibiotika sind Tyrocidin [Mootz & Marahiel, 1997a], Bacitracin [Konz *et al.*, 1997], Surfactin [Peypoux *et al.*, 1999], Fengycin [Steller und Vater, 2000] (alle aus *Bacillus* Spezies) und das als Reserve gegen multiresistente Erregerstämme geltende Vancomycin aus *Streptomyces orientalis* [Hubbart & Walsh, 2003]. Diese Moleküle beinhalten Strukturmerkmale, die für ihre Bioaktivität eine entscheidende Rolle spielen. So ist in Bacitracin ein Thiazolin-Heterozyklus vorhanden, während Surfactin und Fengycin N-terminale Fettsäurereste unterschiedlicher Länge aufweisen, wodurch sie zugleich amphiphile, also biotenside und hemolytische Eigenschaften erhalten. Die außergewöhnlichen Modifikationen des Vancomycins umfassen oxidatives *crosslinking*, Halogenierung und Glycosylierung [Walsh, 2002]. Seltene Aminosäuren und ein hoher Grad an N-Methylierung werden in dem toxischen Immunsuppressivum Cyclosporin aus *Tolypocladium niveum*, das nach Organtransplantationen eingesetzt wird, vorgefunden [Weber *et al.*, 1994]. Das sich durch Thiazol-Heterozyklen und Glycosylierung auszeichnende Bleomycin [Du *et al.*, 2000] zeigt ebenso wie das Acylpeptid Actinomycin aus *Streptomyces chrysomallus* [Schauwecker *et al.*, 1998; Pfennig *et al.*, 1999] eine zytostatische (cancero-statische) Wirkung, während das mit einer Epoxifettsäure ausgestattete HC-Toxin aus *Cochliobolus carbonum* [Ahn & Walton, 1997] ein Phytotoxin ist. Sogenannte Siderophore sind beispielsweise Bacillibactin aus *Bacillus subtilis* [May *et al.*, 2001] und Yersiniabactin aus *Yersinia pestis* [Miller *et al.*, 2002]. Diese Verbindungen werden von ihren Wirtsorganismen bei Eisenmangel synthetisiert und enthalten als Strukturmerkmale Dihydroxybenzoat (DHB) bzw. Heterozyklen. Sie werden gebildet um Eisen in der Umgebung zu chelatisieren und als Komplex in die Zelle zu transportieren, wo es dann freigesetzt wird. Obwohl die



Siderophore pharmakologisch eher uninteressant sind, bieten ihre Synthesysteme Angriffspunkte zur Bekämpfung von pathogenen Stämmen, die diese Überlebensstrategie nutzen.

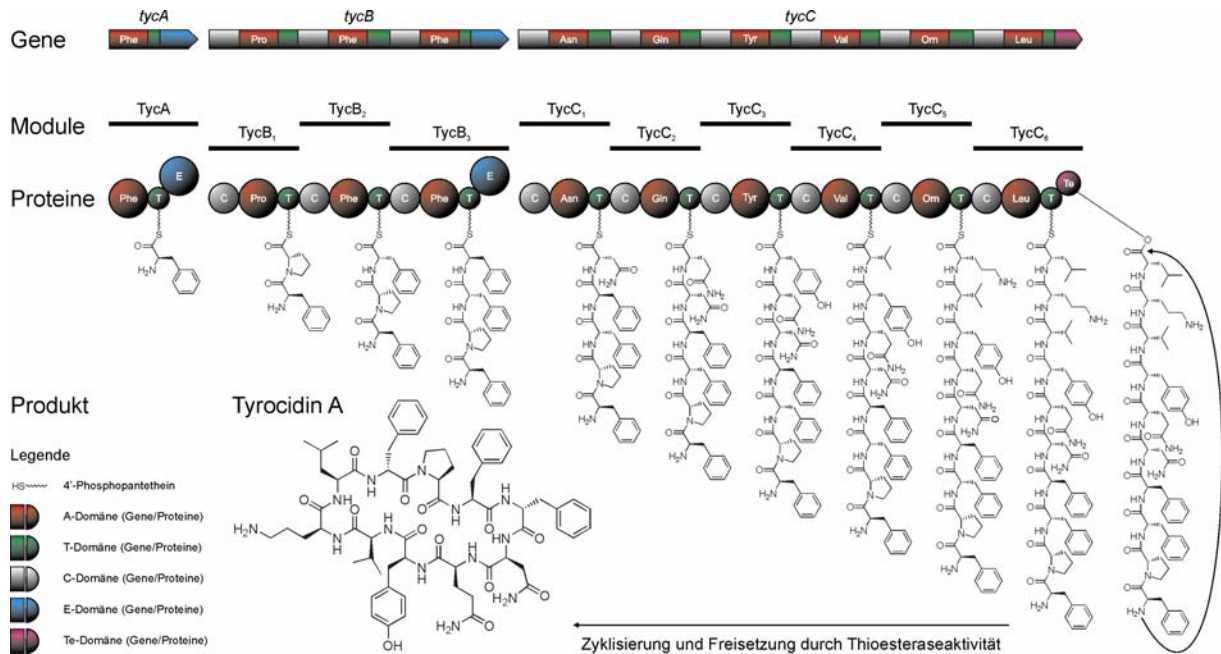


**Abbildung 2-1** Eine Auswahl nichtribosomal synthetisierter Naturstoffe. Strukturelle Besonderheiten sind farblich hervorgehoben. Dabei sind Bestandteile wie Fettsäuren, Heterozyklen, ausergewöhnliche Aminosäuren und Modifizierungen (z. B. *N*-Methylierungen, Glycosylierungen und Halogenierungen) rot gefärbt, während D-Aminosäuren, die am häufigsten vorgefundenen modifizierten Bausteine, blau dargestellt sind.

## 2.2 Die nichtribosomale Peptidsynthese

Anders als bei der nucleinsäureabhängigen ribosomalen Peptidbiosynthese, bei der die mRNA als Matrize dient, übernimmt bei der nichtribosomalen Peptidsynthese das die Reaktion katalysierende große Enzymsystem selbst die Funktion einer Matrize, an der nach einem Fließbandmechanismus aktivierte Aminosäuren zu einem Polypeptid verknüpft werden [Marahiel *et al.*, 1997; Finking & Marahiel, 2004; Sieber & Marahiel, 2005]. Die Enzymsysteme können dabei beachtliche Größen aufweisen. So werden die elf Aminosäuren des Cyclosporins an nur einer Synthetase von 1.69 MDa zu einem Makrozyklus assembliert [Weber *et al.*, 1994]. Durch genetische und biochemische Charakterisierungen gewonnene Erkenntnisse über die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) zeigten Ähnlichkeiten zu den ebenfalls modular aufgebauten Polyketidsynthetasen (PKS) [Cane & Walsh, 1999; Schwarzer & Marahiel, 2001] auf. Der Vorschlag des *thiotemplate*- [Lipmann *et al.*, 1971] führte letztlich zum sogenannten *multiple-carrier-thiotemplate*-Mechanismus [Stein *et al.*, 1996] als Modellvorstellung für diese Art der Peptidsynthese. Dem Modell folgend bestehen NRPS aus einer die Primärstruktur des Produkts festlegenden Anzahl sich wiederholender katalytischer Einheiten, die die wachsende Peptidkette um jeweils einen spezifischen Aminosäurerest erweitern und Module genannt werden. Auf Grund dieser Kolinearität stimmt die Aminosäuresequenz der Produkte in der Regel mit der Anzahl der Module in den entsprechenden Synthetasen überein. Jedes Modul, das aus etwa 1000 bis 1500 Aminosäuren besteht, lässt sich in weitere katalytische Untereinheiten aufteilen, die als Domänen bezeichnet werden und jeweils für die Substraterkennung, Substrataktivierung, Verlängerung und Modifikation des Peptids verantwortlich sind. Die Aktivierung der Substrataminosäuren erfolgt in Analogie zu den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der ribosomalen Maschinerie durch Adenylierung in einer ATP-abhängigen Reaktion. Darauf wird der enzymgebundene Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Ppant) mit Hilfe des aktivierten Intermediats an seiner Sulfhydryl-Gruppe aminoacyliert [Lambalot *et al.*, 1996] und kann – als beweglicher Arm fungierend – den über einen Thioester gebundenen Rest zur Kondensreaktion mit der ebenfalls als Thioester am folgenden Ppant aktivierten Aminosäure auf das nächste Modul weiterreichen. Auf diese Art wächst die während des gesamten Elongationsprozesses am Enzym gebundene Peptidkette vom N- zum C-Terminus weiter, bis sie am letzten Modul unter Zyklisierung oder durch Hydrolyse freigesetzt und die Reaktion damit terminiert wird. Dass dabei immer Produkte definierter Länge entstehen, lässt auf eine hohe Substratspezifität der Domänen schließen. Zusätzlich sichern spezifische Kommunikationsmechanismen die Protein-Protein Interaktion zwischen nicht auf der gleichen Polypeptidkette liegender Module [Linne *et al.*,

2003]. Das Prinzip eines Thiotemplat-Enzymsystems und seines modularen Aufbaus soll in Abbildung 2-2 schematisch anhand der nichtribosomalen Synthese des zyklischen Peptid-Antibiotikums Tyrocidin veranschaulicht werden.



**Abbildung 2-2** Schematische Darstellung des Tyrocidin-Operons und der nichtribosomalen Peptidsynthese an den entsprechenden Synthetasen. Jedes Modul (TycA bis TycC<sub>6</sub>) erweitert das vom N- zum C-Terminus wachsende Polypeptidprodukt um genau einen Aminosäurebaustein. Am Ende wird ein definiertes Molekül (nach Zyklisierung) vom Enzymtemplat freigesetzt.

## 2.3 Domänenstruktur von NRPS-Modulen

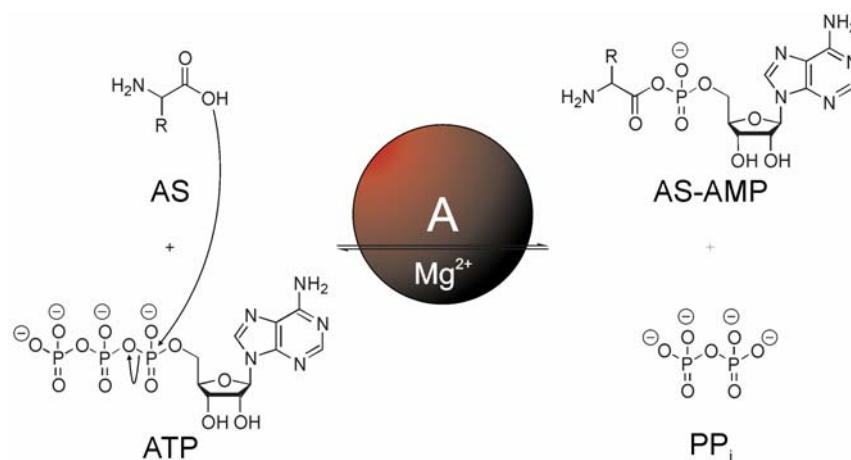
Wie bereits angedeutet werden die kleinsten katalytischen Einheiten von NRPS, die einem Modul den Einbau genau einer Aminosäure in die Peptidkette ermöglichen, als Domänen bezeichnet [Stachelhaus *et al.*, 1995a]. Sie bieten eine eigenständige enzymatische Aktivität, sind in vielen Fällen auch einzeln exprimiert aktiv und können anhand sogenannter *core-Motive* (s. Anhang) auf Proteinebene identifiziert werden. Anzahl und Eigenschaften der Domänen, aus denen ein Modul besteht, bestimmen dessen Funktion genauso wie seine Position innerhalb des Enzymkomplexes. Ein N-terminal lokalisiertes Initiationsmodul (z. B. TycA in Abbildung 2-2) enthält in der Regel nur die für die Substraterkennung und -aktivierung verantwortliche Adenylierungsdomäne (A-Domäne) und die häufig auch als *peptidyl carrier protein* (PCP) bezeichnete Thiolierungsdomäne (T-Domäne). Letztere trägt den Kofaktor Ppant (4'-Phosphopantethein), auf den die Aminosäure von der A-Domäne übertragen wird. Für die Verlängerung der Peptidkette benötigt ein Elongationsmodul (z. B.

TycB<sub>1</sub>–TycC<sub>5</sub> in Abbildung 2-2) zusätzlich zu den oben genannten noch die Kondensationsdomäne (C-Domäne), welche die Peptidbindungsbildung katalysiert. Das Produkt wird am Ende der Synthese vom letzten Modul, dem Terminationsmodul (z. B. TycC<sub>6</sub> in Abbildung 2-2), durch eine Terminationsdomäne [meist eine Thioesterasedomäne (Te-Domäne)] freigesetzt. Die Synthese eines Polypeptids ist prinzipiell nur mit Hilfe dieser vier Domänen möglich; sie sind somit essentiell. Zusätzlich in einem Modul enthaltene Domänen, die dementsprechend optional sind, nehmen Modifikationen an den Aminosäuren bzw. der wachsenden Peptidkette vor und dienen somit entscheidend der Diversifikation von Produktstrukturen, z. B. E-Domänen (Epimerisierung), Ox-Domänen (Oxidation) und M-Domänen (*N*-Methylierung). Nicht essentielle Domänen können auch essentielle substituieren, wobei sie Funktionen wie Heterozyklisierung (Cy- statt C-Domäne) oder Reduktion (R- statt Te-Domäne) übernehmen [Schwarzer & Marahiel, 2001].

Weitere Modifikationen – wie zum Beispiel die Glykosilierung der Vancomycin Vorstufe – werden erst nach Fertigstellung und Freisetzung des Produkts durch externe Proteine vorgenommen [Smith *et al.*, 1990; Walsh *et al.*, 2001].

### 2.3.1 Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne)

A-Domänen kontrollieren den initiiierenden Schritt in der nichtribosomalen Peptidsynthese. Sie erkennen spezifisch eine Amino- oder Carboxysäure und aktivieren diese durch Bildung des entsprechenden Adenylats in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> und ATP [Dieckmann *et al.*, 1995] (Abbildung 2-3).



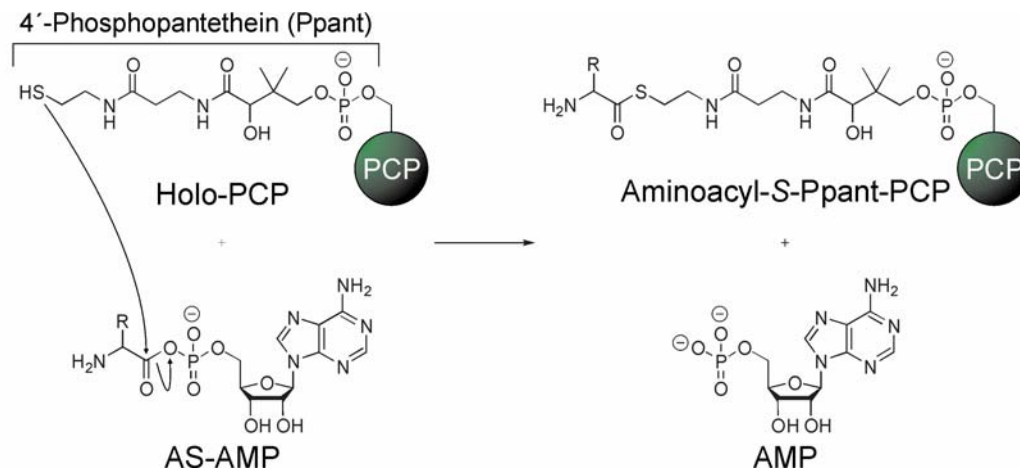
**Abbildung 2-3** Erkennung und Aktivierung der Aminosäuren. Die durch die A-Domänen katalysierte Aminoacylierung von ATP in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> ist reversibel (AS: Aminosäure, ATP: Adenosintriphosphat, AS-AMP: Aminoacyladenylat, PP<sub>i</sub>: anorganisches Pyrophosphat).

Das Voranschreiten dieser Gleichgewichtsreaktion wird durch die hohe Hydrolyseenergie von ATP auf Grund der sich zwischen den Phosphorsäureanhydrid-Bindungen abstoßenden negativen Ladungen begünstigt. Weitere Hydrolyse des aus der Reaktion hervorgehenden anorganischen Pyrophosphats ( $PP_i$ ) zu mesomeriestabilisiertem Orthophosphat ( $P_i$ ) verschiebt die Reaktion ganz auf die Seite der Produkte. Die hohe Selektivität dieser aus etwa 550 Aminosäuren bestehenden Untereinheiten und ihre Anordnung innerhalb eines Synthetasystems legt die Aminosäuresequenz der Produkte fest. A-Domänen sind autonome katalytische Einheiten, die auch einzeln exprimiert aktiv sind [Mootz & Marahiel, 1997], jedoch zeigen sie im Vergleich zu den bei der ribosomalen Maschinerie adenylatbildenden tRNA-Synthetasen eine geringere Substratspezifität. Nach erfolgreicher Kristallisation und Strukturanalyse der A-Domäne (PheA) der Gramicidin S-Synthetase A (GrsA) mit Substrataminosäure und ATP konnten wichtige Erkenntnisse über die Lage des aktiven Zentrums, die Substraterkennung und Aktivierung auf struktureller Ebene gewonnen werden [Conti *et al.*, 1997]. Die Struktur weist eine kleine C-terminale und eine große N-terminale Untereinheit auf und zeigte bei Vergleichen Ähnlichkeiten mit der Luciferase aus *Photinus pyralis*, nicht jedoch mit tRNA-Synthetasen. Sequenzvergleiche mit anderen A-Domänen enthüllten in Kombination mit Untersuchungen des aktiven Zentrums die Substratbindungstasche einschließlich der an der Koordination des Substrats beteiligten zehn Aminosäurereste zwischen den *core*-Sequenzen A4 und A5, welche als „nichtribosomaler Code“ für die Substraterkennung von A-Domänen definiert wurden [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Dieser Code erlaubt sowohl eine eingeschränkte Vorhersage der Substratspezifität noch nicht charakterisierter NRPS über die Sequenzanalyse als auch eine gezielte Veränderung der Selektivität von A-Domänen durch Mutationen [Eppelmann *et al.*, 2002]. Die Kristallstrukturanalyse der alleinstehenden, Dihydroxybenzoat aktivierenden A-Domäne DhbE des Bacillibactin-Systems [May *et al.*, 2002] war hilfreich für die Ausweitung des „nichtribosomalen Codes“ auf Carboxysäuren aktivierende A-Domänen.

### 2.3.2 Die Thiolierungsdomäne (T-Domäne) oder PCP (*Peptidyl Carrier Protein*)

Die Transporteinheiten der NRPS sind die etwa 80–100 Aminosäuren großen Thiolierungs- (T-) Domänen, die in der Regel direkt an den C-Terminus von A-Domänen angrenzen und keine inhärente katalytische Aktivität aufweisen [Stachelhaus *et al.*, 1996]. Sie übernehmen die von der A-Domäne als Aminoacyladenylat aktivierten Aminosäuren [Ehmann *et al.*, 2000] und vermitteln auftretende Reaktionsintermediate zu den unterschiedlichen katalytischen Zentren. Die Zwischenstufen der Peptidsynthese werden dabei auf die Sulfhydryl-Gruppe des

an einem hoch konservierten Serinrest im *core*-Motiv der T-Domäne sitzenden 4'-Phosphopantethein-Kofaktors (Ppant) übertragen und stehen so enzymgebunden für alle weiteren Reaktionen zur Verfügung (Abbildung 2-4).



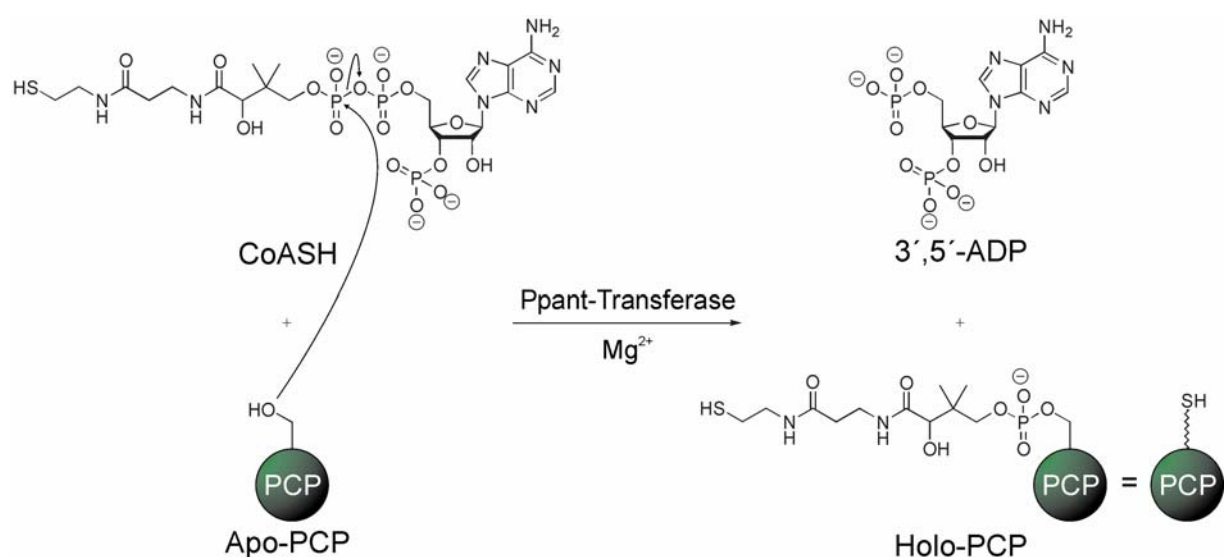
**Abbildung 2-4** Kovalente Bindung der Substratamino­säuren. Das PCP (T-Domäne) übernimmt mit der Thiofunktion seines Ppant-Kofaktors. Die Reaktion wird dabei durch die Freisetzung von AMP angetrieben. Auf Grund der Flexibilität des Ppant-Armes, der hier im Detail dargestellt ist, erhalten die PCPs ihre Eigenschaft eines Transportproteins und interagieren mit den katalytischen Einheiten der Synthetasen.

Der Vorteil, den als Thioester gebundene Intermediate gegenüber ihren Oxo-Analoga, wie sie bei der ribosomalen Peptidsynthese zu finden sind, bieten, beruht auf der rascheren Reaktion mit Nucleophilen durch den im Vergleich zu einer –O–R-Gruppe erheblich geringeren + M-Effekt einer –S–R-Gruppe. Schwefel kann der Doppelbindungsregel zufolge weniger Beitrag zu stabilen  $p_\pi$ ,  $p_\pi$ -Doppelbindungen und somit zur Mesomeriestabilisierung der Esterbindung leisten [Brückner, 1996]. Auf diese Art stellen die enzymgebundenen Zwischenstufen weiterhin gute Acylierungsmittel für die Elongation des Peptids dar. Da wie angedeutet nicht nur Aminoacyl-, sondern auch Peptidylreste eines vorhergehenden Moduls von der T-Domäne übernommen und nach Verlängerung auf das nächste Modul weitergereicht werden, bezeichnet man die T-Domäne auch als PCP (*peptidyl carrier protein*), was zugleich ihre Ähnlichkeit mit den entsprechenden als ACP (*acyl carrier protein*) bezeichneten Einheiten der Fettsäure- und Polyketidsynthetasen verdeutlichen soll. Entsprechend werden T-Domänen, die vorwiegend in Siderophor-Synthetasen gefunden werden und Arylsäuren übernehmen (z. B. in EntB bei der Enterobactin-Synthese), als *aryl carrier* Proteine (ArCPs) bezeichnet. Die Übereinstimmungen von PCPs und ACPs konnten auf struktureller Ebene mit Hilfe von NMR-Techniken (*nuclear magnetic resonance*) anhand

der T-Domäne aus der Tyrocidin-Synthetase C<sub>3</sub> (TycC<sub>3</sub>-PCP) bestätigt werden [Weber *et al.*, 2000], wobei das Fehlen einer Bindungstasche in der Vier-Helix-Struktur auch die fehlende Substratspezifität von PCPs erklärte. Es wurde entdeckt, dass PCPs, die N-terminal von C-Domänen (s. 2.3.3) lokalisiert sind (PCP<sup>C</sup>s), nicht produktiv mit E-Domänen interagieren können [Linne *et al.*, 2001]. Man unterscheidet daher zwischen PCP<sup>C</sup>s (*core* T: GGHSI) und PCP<sup>E</sup>s, die N-terminal von E-Domänen (s. 2.3.6.1) vorzufinden sind (*core* T: GGDSI). Kürzlich wurden über eine ausgedehnte NMR-Studie des TycC<sub>3</sub>-PCPs drei untereinander wechselnde Zustände der Konformation für PCPs in der Apo- (A-), Apo-/Holo- (A/H-) und Holo- (H-) Form dargestellt [Koglin *et al.*, 2006]. Zum einen konnten so die Bewegungen des Ppant-Arms und zum anderen spezifische Interaktionen mit Ppant-Transferasen (s. 2.3.2.1) im A-Zustand und Thioesterasen des Typs II (s. 2.3.5) im H-Zustand nachvollzogen werden.

### 2.3.2.1 Posttranslationale Modifikation von T-Domänen

Für die Überführung von T-Domänen in aktive *carrier* Proteine ist eine posttranslationale Modifikation unerlässlich. Diese Umwandlung der T-Domänen von der inaktiven Apo- in die aktive Holo-Form geschieht mit der Übertragung des Ppant-Kofaktors von Coenzym A auf die Hydroxyl-Gruppe des im *core* T-Motiv hoch konservierten Serinrests unter Katalyse durch Ppant-Transferasen in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> [Lambalot *et al.*, 1996] (Abbildung 2-5). Auf Grund ihrer Bedeutung für diese auch als *priming* bezeichnete Reaktion nehmen die Ppant-Transferasen eine essentielle Stellung bei der nichtribosomalen Peptidsynthese ein.



**Abbildung 2-5** Posttranslationale Modifikation des PCPs. Ppant-Transferasen binden CoA und katalysieren den Transfer des Ppant-Kofaktors auf den invarianten Serinrest der *carrier*-Domänen (3',5'-ADP: 3',5'-Adenosindiphosphat).

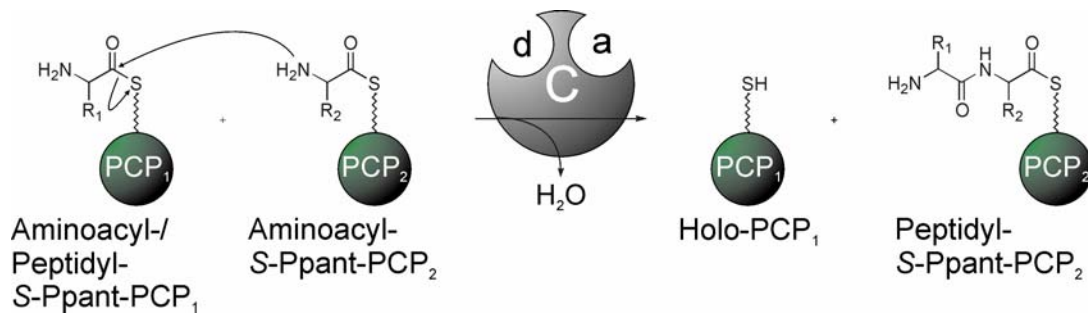
Eine erstaunliche Entdeckung war, dass Ppant-Transferasen, die dem primären Metabolismus zugehörig sind und normalerweise ACPs in die aktive holo-Form überführen, nicht PCPs modifizieren. Die mit dem Surfactin Biosyntheseoperon aus *Bacillus subtilis* assoziierte Ppant-Transferase (Sfp) ist jedoch in der Lage, die Ppant-Übertragung sowohl auf ACPs als auch auf PCPs zu katalysieren [Weinreb *et al.*, 1998; Quadri *et al.*, 1998; Suo *et al.*, 2001]. Für die Erkennung durch Ppant-Transferasen nimmt die zweite Helix der *carrier* Proteine offenbar eine wichtige Funktion ein [Mofid *et al.*, 2002]. Die Lösung der Kristallstruktur des etwa 240 Aminosäuren großen Sfps offenbarte eine pseudohomodimere Faltung [Mofid *et al.*, 1999; Reuter *et al.*, 1999], und anschließende strukturbasierte Mutationsexperimente führten zur Identifizierung von Bindungsstellen für die Protein-Protein Interaktion [Mofid *et al.*, 2004]. Eine flexible *loop*-Region, mit der Sfp vermutlich *carrier* Proteine erkennt, erklärt dabei die Toleranz gegenüber variierenden Protein-Substraten, die auch alternative Peptid-*tags* sein können [Yin *et al.*, 2005]. Außerdem weist Sfp eine breite Toleranz gegenüber Aminoacyl- [Belshaw *et al.*, 1999], Peptidyl- [Sieber *et al.*, 2003] oder anders modifizierter CoA-Analoga [La Clair *et al.*, 2004] auf, was vermutlich darauf beruht, dass der Ppant-Anteil des Sfp gebundenen CoA-Substrats weitestgehend nicht mit dem Enzym interagiert und aus der Struktur herausragt [Reuter *et al.*, 1999]. Diese Substrattoleranz von Sfp war von großem Nutzen für Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden.

### 2.3.3 Die Kondensationsdomäne (C-Domäne)

Für die vollständige Funktion von Elongationsmodulen sind neben den A- und T-Domänen die etwa 450 Aminosäuren großen, an das N-terminale Ende von A-Domänen angrenzenden Kondensations- (C-) Domänen essentiell [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Sie katalysieren die Bildung der Peptidbindung zwischen dem am Ppant-Arm einer T-Domäne als Thioester gebundenen Acyl- oder Peptidylrest eines Moduls (Donor) und dem Aminoacylrest, der in gleicher Weise an der T-Domäne des folgenden Moduls gebunden ist (Akzeptor). Dabei findet ein nucleophiler Angriff der freien Aminogruppe der Akzeptoraminosäure auf das Carbonyl-C-Atom des energiereichen Thioesters, über den die Donor-Aminoacyl- oder Peptidyleinheit aktiviert ist, statt (Abbildung 2-6). Nach der Kondensationsreaktion befindet sich die um eine Aminosäure verlängerte Peptidkette auf dem Ppant der dem Akzeptormodul zugehörigen T-Domäne und kann zur weiteren Elongation auf das nächste (*downstream*) Modul weitergereicht werden. Der Katalysemechanismus dieser Reaktion konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden, allerdings unterstreichen Ergebnisse einer Mutationsstudie die Rolle



des zweiten konservierten Histidins im *core*-Motiv C3 [MHHxISDG(WV)S] für die enzymatische Aktivität von C-Domänen [Bergendahl *et al.*, 2002].



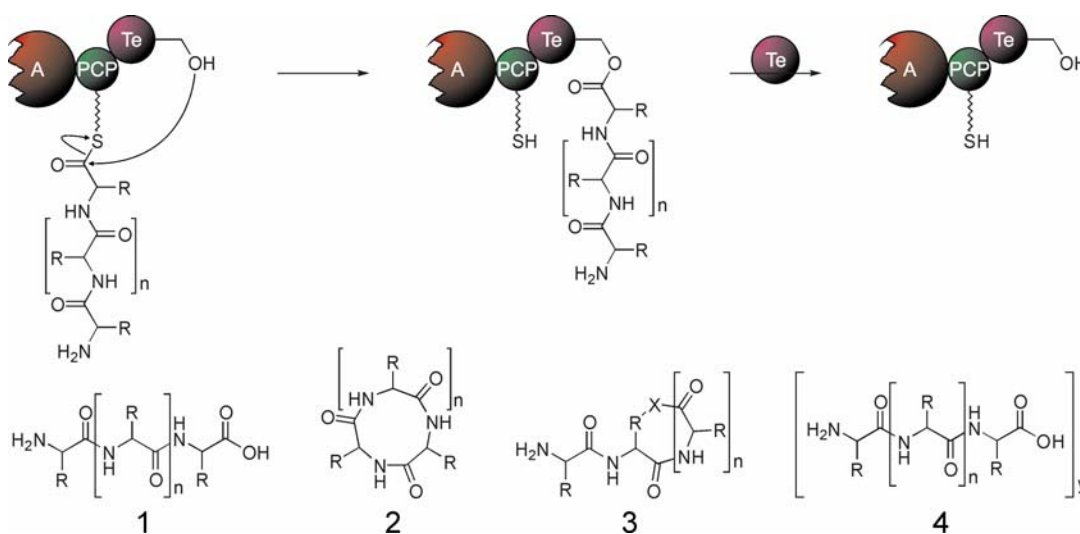
**Abbildung 2-6** Elongation. Die C-Domäne katalysiert die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen zwei über Thioester an benachbarten PCPs gebundenen Reaktionsintermediaten, wobei ein nucleophiler Angriff des in der Akzeptorstelle (a) befindlichen Aminoacyl-Substrats auf das in der Donorstelle (d) koordinierte Aminoacyl- oder Peptidyl-Substrat stattfindet. Nach der erfolgten Kondensation, aus der formell ein Molekül Wasser hervorgeht, befindet sich die elongierte Peptidkette auf dem *downstream* PCP (PCP<sub>2</sub>).

Einem Modell zufolge besitzen C-Domänen eine *downstream* Akzeptor- und eine *upstream* Donor-Bindungstasche. Eine biochemische Charakterisierung von C-Domänen gelang durch Fehlbeladung (*mispriming*) von PCPs mit Sfp und Aminoacyl- bzw. Peptidyl-CoAs (s. 2.3.2.1) und anschließender Elongationsreaktionen. Dabei wurde deutlich, dass C-Domänen eine höhere Selektivität gegenüber der modulspezifisch aktivierten Akzeptor-aminosäure als gegenüber dem Donorelektrophil des vorangehenden Moduls aufweisen [Belshaw *et al.*, 1999, Ehmann *et al.*, 2000]. Allerdings ist die Donor-Bindungstasche im Falle einer vorausgehenden Epimerisierungsreaktion (s. 2.3.6.1) stereoselektiv und akzeptiert nur ein D-Isomer für die Kondensation, so dass hier von <sup>D</sup>C<sub>L</sub>-Katalysatoren gesprochen wird [Clugston *et al.*, 2003]. Zudem verhindern N-terminal an einer Synthetase lokalisierte C-Domänen eine Misinitiation der Peptidsynthese [Linne & Marahiel, 2000]. Somit sind C-Domänen neben den A-Domänen mit verantwortlich für die hohe Spezifität von NRPS. Die gelöste Kristallstruktur der alleinstehenden C-Domäne VibH des Vibriobactin-Systems aus *Vibrio cholerae* wies Ähnlichkeiten zur Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) und zu Dihydrolipoamidacyl-transferasen auf [Keating *et al.*, 2002]. Im Gegensatz zu letzteren, die als Homotrimere vorliegen, ist VibH ein monomeres Pseudodimer aus αβα-Sandwichstrukturen. Ein Solventkanal, in den von beiden Seiten die Substrate eindringen können, verläuft durch das Protein an der Grenze zwischen N- und C-terminaler Untereinheit. Der Struktur zufolge würde die C-Seite der Donor-Bindungsstelle des Elektrophils und die N-

Seite der Akzeptor-Bindungsstelle des Nucleophils entsprechen, was die bisherige Modellvorstellung stützt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Informationen zur Substratspezifität der C-Domäne aus der Tyrocidin-Synthetase B<sub>1</sub> (TycB<sub>1</sub>-C) gewonnen werden.

### 2.3.4 Die Thioesterasedomäne (Te-Domäne)

Der letzte essentielle Schritt in der nichtribosomalen Peptidsynthese ist die Freisetzung des fertiggestellten Produkts durch Terminationsdomänen, die sich am Ende des C-terminalen NRPS-Moduls (Terminationsmodul) befinden. Die Termination kann unter anderem an C- (in manchen fungalen Systemen, z. B. bei der Cyclosporin-Biosynthese [Weber *et al.*, 1994]) oder R-Domänen (s. 2.3.6.7) erfolgen. In den meisten Fällen wird diese Reaktion jedoch durch die etwa 250 Aminosäuren großen Thioesterasedomänen, die das hoch konservierte Motiv G(HY)SxG enthalten, katalysiert [Schneider & Marahiel, 1998]. Das Motiv enthält im Zentrum einen Serinrest, der als Teil einer katalytischen Triade (Asp, His, Ser) entscheidend am Terminationsprozess beteiligt ist. Zur katalytischen Produktfreisetzung wird zunächst das auf dem Ppant der letzten T-Domäne befindliche lineare Polypeptid durch einen nucleophilen Angriff des Te-Serinrests auf das Carbonyl-C-Atom des Peptidyl-Ppant-Thioesters von der Te-Domäne in Form eines Oxo-Esters übernommen. Darauf kann entweder durch Hydrolyse ein lineares Peptid oder unter Makrolactam- oder Lactonisierung ein zyklisches bzw. verzweigt zyklisches Produkt abgespalten werden (Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7** Reaktionstermination. Bei der durch Thioesterasen katalysierten Produktfreisetzung entstehen lineare (1), zyklische (2), verzweigt zyklische (3) (X = N, O) oder multimere Produkte.

Während die Thioesterase nach dem ersten Fall (Wasser als externes Nucleophil) eine Hydrolase darstellt (z. B. bei der Yersiniabactin- [Miller *et al.*, 2002] oder Pyochelin- [Patel & Walsh, 2001] Biosynthese), führt im zweiten Fall der nucleophile Angriff einer Seitengruppe des Peptids oder der Aminogruppe des Peptid-N-Terminus (peptidinternes Nucleophil) auf das Carbonyl-C-Atom des Esters zur Bildung des Makrolactams oder -lactons, und die Thioesterase übernimmt die Funktion einer Zyklase (z. B. bei der Tyrocidin A- [Trauger *et al.*, 2000] oder Surfactin- [Bruner *et al.*, 2002] Biosynthese). In einigen NRPS-Systemen katalysieren Te-Domänen auch eine Produktabspaltung nach Oligomerisierung und Zyklisierung von monomeren Peptideinheiten. So werden beispielsweise bei der Gramicidin S-Biosynthese [Krättschmar *et al.*, 1989] zwei Pentapeptide *head to tail* zyklolactamisiert, und bei der Enterobactin-Biosynthese findet eine Zyklolactonisierung unter Trimerisierung statt [Shaw-Reid *et al.*, 1999]. Die Kristallisation und Strukturanalyse der Te-Domäne des Surfactin-Operons (Srf-Te) bestätigte eine Zugehörigkeit dieser Terminationsdomänen zur Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen [Bruner *et al.*, 2002]. Darauf aufbauende Untersuchungen und eine Kokristallisation mit Substrat bestätigten den postulierten Mechanismus, gaben detaillierte Einblicke in das aktive Zentrum und führten zur Charakterisierung der Srf-Te als Depsipeptid-Zyklase [Tseng *et al.*, 2002]. Te-Domänen können als getrennte Einheiten mit synthetisch hergestellten, löslichen Peptidyl-Thioester-Derivaten von *N*-Acetylcysteamin (SNAC) [Trauger *et al.*, 2000] oder Thiophenol [Sieber *et al.*, 2004] als Substratanaloga sowie durch Beladung von PCP-Te-Domänen mit Peptidyl-CoAs [Sieber *et al.*, 2003] charakterisiert werden. Dieses chemoenzymatische Vorgehen eignet sich in besonderem Maße für die Variation von Substraten bei Synthese und *screening* von neuen biologisch aktiven Peptiden [Grünewald *et al.*, 2004].

### 2.3.5 Die Typ II-Thioesterase (Tell)

Externe etwa 220 – 340 Aminosäuren große sogenannte Typ II-Thioesterasen, die als integrierter Bestandteil in Peptidsynthetase-Operons ausgemacht werden konnten, leisten einen Beitrag zur Produktivität von Synthetasen als *proofreading*-Enzyme. Es wurde gezeigt, dass sie durch Fehlbeladung entstandene Zwischenprodukte vom Enzymtemplat abspalten und somit zum einen die Produktspezifität und zum anderen die reibungslose Funktion der NRPS verifizieren [Schneider & Marahiel, 1998]. Auch in diesen Thioesterasen konnte durch eine Mutationsanalyse eine katalytische Triade identifiziert und die Enzyme der Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen zugeordnet werden [Linne *et al.*, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass Te

II-Domänen die Abspaltung von Acylresten an PCPs, die durch Ppant-Transferasen mit Acyl-CoASHs fehlmodifiziert worden sind, katalysieren und somit der Regeneration von NRPS dienen [Schwarzer *et al.*, 2002]. Zusätzlich scheinen sie Synthetasen auch dann zu deblockieren, wenn diese durch Beladung mit einem nicht kognaten Aminoacylrest an der Elongation der Peptidkette gehindert werden [Yeh *et al.*, 2004].

### 2.3.6 Optionale modifizierende Domänen

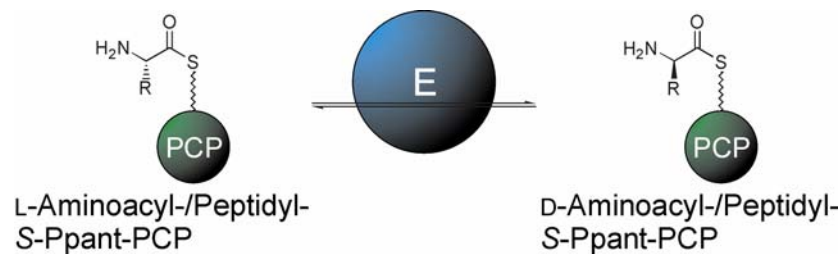
Die bereits erwähnten optionalen Domänen übernehmen modifizierende Aufgaben in NRPS-Systemen *in cis* und verbreitern maßgeblich die strukturelle Vielfalt sowie die biologische Aktivität von nichtribosomal synthetisierten Produkten [Walsh *et al.*, 2001], was diese zugleich wesentlich von ribosomal synthetisierten Peptiden abhebt.

Eine genauere Betrachtung der Epimerisierungs- (E-) Domänen erfolgt auf Grund ihrer Bedeutung für diese Arbeit, wobei mechanistische Aspekte, ihre Klassifizierung und Bedeutung an späterer Stelle behandelt werden (s. 2.5 und 2.6).

#### 2.3.6.1 Die Epimerisierungsdomäne (E-Domäne)

Sind die etwa 400 Aminosäuren großen Epimerisierungsdomänen in NRPS-Systemen enthalten, grenzen sie direkt an das C-terminale Ende von T-Domänen des eigenen Moduls an und befinden sich vor der C-Domäne des darauffolgenden Moduls. In bakteriellen Komplexen bilden sie häufig das C-terminale Ende einer Synthetase [Marahiel *et al.*, 1997]. Diese terminalen E-Domänen sind neben ihrer katalytischen Aufgabe auch an der *in trans* Erkennung und Interaktion der Enzyme beteiligt (s. 2.4 [Linne *et al.*, 2003]). Sind sie an ihrem N- und C-Terminus kovalent mit weiteren Domänen verbunden, wird von internen E-Domänen gesprochen. Ein neuartiger Typ von E-Domänen, die ähnlich den N-Methylierungsdomänen (s. 2.3.6.5) in A-Domänen insertiert sind, wurde in den Synthetasen PchE des Pyochelin-Systems und HMWP2 des Yersiniabactin-Systems entdeckt [Patel *et al.*, 2003]. Die von E-Domänen katalysierte Modifikationsreaktion besteht in einer Epimerisierung, also der Inversion des Chiralitätszentrums am C $_{\alpha}$ -Atom von als Thioester Ppant-PCP gebundenen Intermediaten der nichtribosomalen Peptidsynthese (Abbildung 2-8). Diese Reaktion, die sowohl von L nach D als auch umgekehrt abläuft, unterliegt einem sich sehr schnell einstellenden Gleichgewicht [Stachelhaus & Walsh, 2000; Luo *et al.*, 2001]. Sowohl die Umwandlung eines Aminoacyl-S-PCPs am C $_{\alpha}$  von der L- in die D-Konfiguration vor dem Weiterreichen auf das nächste Modul [Stein *et al.*, 1995] als auch die der direkt

Thioester gebundenen Aminosäure eines Peptidyl-S-PCPs nach erfolgter Kondensationsreaktion [Stindl & Keller, 1994] werden von E-Domänen unterstützt. Die erste Reaktion wird von E-Domänen in Initiationsmodulen (Aminoacyl-E-Domänen), letztere von E-Domänen in Elongationsmodulen (Peptidyl-E-Domänen) katalysiert.



**Abbildung 2-8** Epimerisierung. Die von E-Domänen katalysierte Reaktion besteht in der einem Gleichgewicht unterliegenden Racemisierung eines enzymgebundenen Aminoacyl- oder Peptidyl-Substrats.

Es konnte bestätigt werden, dass die Bindung eines L-Aminoacylrests an der Akzeptorstelle von C-Domänen in Elongationsmodulen die E-Domäne solange an der Epimerisierung des Substrats hindert, bis die Kondensationsreaktion stattgefunden hat und der Peptidylrest aus der Akzeptorbindungstasche freigesetzt wird [Linne & Marahiel, 2000]. Die nachfolgende <sup>D</sup>C<sub>L</sub>-Domäne (s. 2.3.3) selektiert wiederum die aus der von der E-Domäne katalysierten Gleichgewichtsreaktion hervorgehenden D-konfigurierten Enantiomere bzw. Diastereomere und sichert so die Produktspezifität [Belshaw *et al.*, 1999; Clugston *et al.*, 2003]. Es gibt zwar Hinweise für eine gewisse Substratspezifität von E-Domänen [Luo *et al.*, 2001], aber auch für eine gewisse Toleranz. So akzeptiert und invertiert die zum Phe spezifischen Initiationsmodul TycA gehörige E-Domäne auch Trp, Ile und Val mit nur leicht verminderter Aktivität [Linne *et al.*, 2001]. Die zum ebenfalls Phe spezifischen Elongationsmodul TycB<sub>3</sub> gehörige Peptidyl-E-Domäne epimerisiert auch ein Phe-S-Ppant anstelle des kognaten Tetrapeptidyl-Substrats Phe-Phe-Pro-Phe-S-Ppant, jedoch mit merklich beeinträchtigter Effizienz [Linne & Marahiel, 2000]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von E-Domänen nur bei N-terminaler Verbindung mit speziellen T-Domänen (PCP<sup>E</sup>s) erhalten bleibt [Linne *et al.*, 2001]. So sind E-Domänen, die mit dem PCP<sup>E</sup> eines anderen Moduls fusioniert werden, weiterhin effiziente Enzyme, verlieren aber ihre Aktivität, wenn sie mit T-Domänen fusioniert werden, die normalerweise C-Domänen vorausgehen (PCP<sup>C</sup>s).

Den bisherigen Erkenntnissen über E-Domänen zufolge ist eine Klassifizierung in Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domänen – abgesehen von ihrer nativen Position in einer

Synthetase – nicht eindeutig möglich. Detaillierte Untersuchungen zur Substratspezifität und Funktionalität von E-Domänen, die zur Evaluation des Nutzens von E-Domänen für die kombinatorische Biosynthese mit NRPS beitragen, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschrieben.

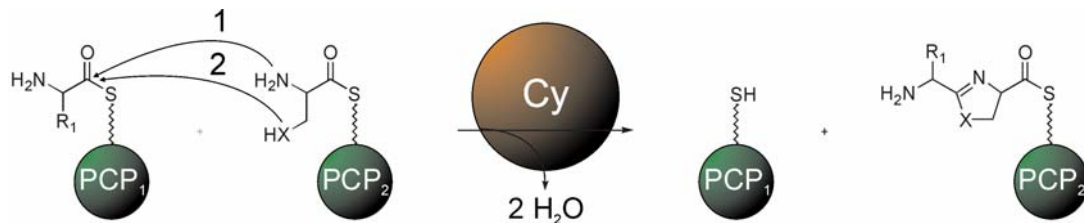
#### 2.3.6.2 Die duale Kondensations-/Epimerisierungsdomäne (C/E-Domäne)

Kürzlich wurden Domänen mit zweifacher Funktion im Arthrofactin-Biosynthesystem der *Pseudomonas* Spezies MIS38 identifiziert [Balibar *et al.*, 2005]. Die ersten sechs Aminosäuren von Arthrofactin liegen in der D-Konfiguration vor, obwohl in den Synthetasen weder E-Domänen noch für D-Aminosäuren spezifische A-Domänen entdeckt werden konnten. Es wurde gezeigt, dass hier die putativen C-Domänen ein *upstream* PCP gebundenes Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Ppant-Substrat epimerisieren, sofern am *downstream* PCP auch bereits ein Aminoacyl-Substrat bereitsteht. Darauf wird vermutlich durch eine Konformationsänderung im Enzym die Kondensation mit  $^D\text{C}_L$ -Selektivität (s. 2.3.3) katalysiert. Das Vorhandensein solcher dualen C/E-Domänen wurde über eine Sequenzanalyse auch in den Biosynthesystemen für Syringomycin, Syringopeptin und Ramoplanin vorhergesagt.

#### 2.3.6.3 Die Zyklisierungsdomäne (Cy-Domäne)

Die etwa 410 Aminosäuren großen Cy-Domänen ersetzen C-Domänen in einigen Modulen, die spezifisch Cystein, Serin oder Threonin in das Peptid einbauen, und katalysieren eine modifizierte Elongationsreaktion. Dabei wird nicht nur eine Peptidbindung geknüpft, sondern es findet zusätzlich die Bildung von heterozyklischen Oxazolin- (z. B. bei der Vibriobactin-Biosynthese [Keating *et al.*, 2000]) oder Thiazolin- (z. B. bei der Bacitracin- [Konz *et al.*, 1997], Yersiniabactin- [Miller & Walsh, 2001] und Pyochelin-Biosynthese [Patel *et al.*, 2003]) Ringen statt (Abbildung 2-9). Diese Heterozyklen nehmen eine wichtige Funktion für die Bioaktivität beispielsweise bei Siderophoren für die Chelatisierung von Metallionen ein. Hinweise auf eine stufenweise Abfolge von Peptid-Kondensation und Heterozyklisierung wurden anhand von zwei aufeinander folgenden Cy-Domänen in der Vibriobactinsynthetase VibF erhalten [Marshall *et al.*, 2002]. Hier katalysiert eine dieser Domänen nur die Kondensation zur Peptidbindung, die andere die Heterozyklisierung. Darauf aufbauend konnte mit einer dimodularen Modellsynthetase aus dem Bacitracin-System in einer Mutationsstudie bestätigt werden, dass Cy-Domänen zunächst die Peptidbildung und darauf die Heterozyklisierung katalysieren [Duerfahrt *et al.*, 2004]. Zudem weisen sie eine mit den

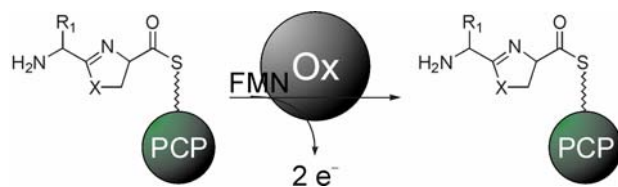
C-Domänen vergleichbare Substratspezifität für das Akzeptor-Nucleophil auf, was die vermutete Ähnlichkeit dieser beiden Domärentypen [Keating *et al.*, 2002] stützt. Kürzlich konnte die *in trans* Aktivität der aus der Epothilon-Synthetase B definiert herausgetrennten Cy-Domäne demonstriert werden [Kelly *et al.*, 2005].



**Abbildung 2-9** Heterozyklisierung bei der nichtribosomalen Peptidsynthese. Die Cy-Domäne katalysiert eine alternative Kondensationsreaktion unter Bildung von Oxazolin- oder Thiazolin-Ringstrukturen. Hinweisen zufolge wird dabei zunächst die Peptidbindung geknüpft (1), wonach der Ringschluss (2) und die Dehydratisierung stattfinden ( $X = O, S$ ).

#### 2.3.6.4 Die Oxidationsdomäne (Ox-Domäne)

Die etwa 250 Aminosäuren umfassenden Ox-Domänen treten in enger Assoziation mit Cy-Domänen auf und katalysieren die Zwei-Elektronen-Oxidation zur Umwandlung von Thiazolin- zu aromatischen Thiazol-Ringen (Abbildung 2-10) beispielsweise inseriert in das C-terminale Ende einer A-Domäne bei der Biosynthese von Epothilon oder als Partner am C-Terminus eines PCPs bei der Bleomycin-Biosynthese [Du *et al.*, 2000]. Die Reaktion, bei der auch die Bildung von Oxazol- aus Oxazolin-Ringen katalysiert wird, geschieht in Gegenwart des Kofaktors Flavinmononucleotid (FMN), der zu FMNH<sub>2</sub> reduziert wird [Schneider *et al.*, 2003].



**Abbildung 2-10** Oxidation von Heterozyklen. Ox-Domänen katalysieren mit FMN die Bildung von aromatischen Oxazol- oder Thiazol- aus Oxazolin bzw. Thiazolin-Ringen ( $X = O, S$ ).

#### 2.3.6.5 Die N-Methylierungsdomäne (M-Domäne)

Die in einigen NRPS-Modulen in das C-terminale Ende einer A-Domäne (zwischen den *core*-Motiven A8 und A9) inserierten etwa 450 Aminosäuren großen N-Methylierungsdomänen (M-Domänen) katalysieren den Transfer einer Methylgruppe vom Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) auf die Aminogruppe einer an der T-Domäne gebundenen

Aminosäure [Haese *et al.* 1993], was der Stabilität der Peptidbindung und damit auch einer längeren Lebensdauer des Produkts dienlich ist. Die M-Domäne ist eher in fungalen NRPS-Systemen verbreitet, während nur wenig Beispiele für ihr Vorkommen in prokaryotischen Synthetasen wie dem Pristinamycin I-System aus *Streptomyces pristinaespiralis* [de Crécy-Lagard *et al.*, 1997] oder dem Actinomycin-System aus *Streptomyces chrysomallus* [Schauwecker *et al.*, 2000] gefunden wurden.

#### 2.3.6.6 Die N-Formylierungsdomäne (F-Domäne)

Im Biosynthesesystem des Anabaenopeptilids aus *Anabaena* Stamm 90 [Rouhiainen *et al.*, 2000] und des linearen Gramacidins aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 [Kessler *et al.*, 2004] findet man am N-Terminus von Initiationsmodulen Domänen, die eine N-Formylierung der ersten Aminosäure katalysieren. An Modellsynthetasen aus dem linearen Gramacidin-System konnte kürzlich gezeigt werden, dass die N-Formylierung für die Initiation der Peptidsynthese von essentieller Bedeutung ist und sowohl der anhand eines Bindungsmotivs vermutete Kofaktor  $N^{10}$ -Formyltetrahydrofolat (fH<sub>4</sub>F) als auch  $N^5$ -fH<sub>4</sub>F für die Reaktion akzeptiert werden [Schoenafinger *et al.*, 2006].

#### 2.3.6.7 Die Reduktasedomäne (R-Domäne)

Eine alternative Art von Terminationsdomänen stellen die etwa 350 Aminosäuren großen Reduktase- (R-) Domänen dar. Ersetzen sie in einem Synthetasesystem die Te-Domäne, wie dies z. B. beim Lys2 aus *Saccharomyces cerevisiae* der Fall ist [Ehmann *et al.*, 1999], werden die Produkte linear unter Reduktion der Thioester gebundenen Carboxylgruppe mit Hilfe des Kofaktors NADPH am C-Terminus als Aldehyd oder Alkohol freigesetzt. Im Fall des linearen Gramacidins konnte gezeigt werden, dass die im Terminationsmodul enthaltene R-Domäne das elongierte Peptid als Aldehyd abspaltet und durch eine externe Reduktase die Umwandlung in das endgültige Produkt mit einer Alkohol-Funktion katalysiert wird [Schracke *et al.*, 2005].

### 2.3.7 Weitere Modifikationen

Lipopeptide wie Surfactin [Cosmina *et al.*, 1993] oder Fengycin [Steller *et al.*, 1999] sind N-terminal mit einer Fettsäurekette modifiziert. Vermutlich übernehmen die C-Domänen, die sich in den entsprechenden Synthetasen am N-Terminus der Initiationsmodule befinden, eine



wichtige Funktion bei der Übertragung der Fettsäuren auf die erste aktivierte Aminosäure. Bei der Daptomycin-Biosynthese sind möglicherweise DptE als adenylat-bildendes Enzym (Acyltransferase) und DptF als *carrier* Protein (ACP) zusätzlich an der Verknüpfung der ersten am Templat gebundenen Aminosäure mit dem Fettsäurerest beteiligt [Miao *et al.*, 2005].

Neben den beschriebenen *in cis* Modifikationen von nichtribosomal synthetisierten Peptiden während der Produktion durch Domänen an den Multienzymen existiert noch eine Reihe interessanter und für die Bioaktivität wichtiger Fertigstellungsschritte, die durch externe Enzyme *in trans* am PCP gebundenen Substrat oder nach Abspaltung des vorläufigen Produkts vorgenommen werden [Walsh *et al.*, 2001]. Bekannt sind unter anderem NADPH abhängige Reduktasen zur Umwandlung von Heterozyklen (z. B. PchG in der Pyochelin-Biosynthese, das die Reduktion eines Thiazolin- zu einem Thiazolidin-Ring katalysiert) oder SAM-abhängige C-Methyltransferasen [Reimann *et al.*, 2001]. Auch Glycosylierungen und oxidatives *crosslinking* spielen für manche nichtribosomal produzierte Peptidprodukte wie Vancomycin eine entscheidende Rolle [Hubbart & Walsh, 2003; Walsh, 2004]. Halogenierungen werden unter anderem bei der Barbamid- [Galonić *et al.*, 2006] oder Syringomycin-Biosynthese an enzymgebundenen Intermediaten in  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ,  $\alpha$ -Ketoglutarat,  $\text{O}_2$  und  $\text{Cl}^-$  abhängigen Reaktionen vorgenommen. Die Lösung der Kristallstruktur der Halogenase SyrB2, die im Gencluster des Syringomycin E-Operons gefunden wurde, gab Aufschluss über den nicht Haem-Eisen abhängigen Reaktionsmechanismus [Blasiak *et al.*, 2006].

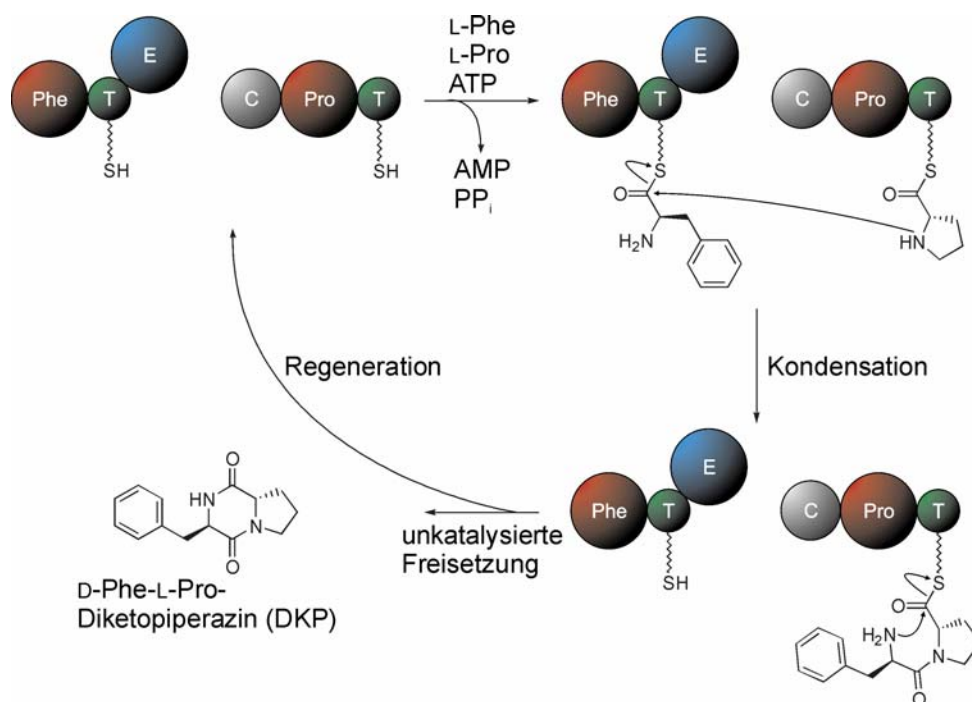
## 2.4 Protein-Protein Interaktion

Vor allem bakterielle NRPS-Systeme sind häufig auf mehrere Proteinstränge verteilt. Dass trotzdem immer ein definiertes Produkt gebildet wird, deutet eine hoch spezifische *in trans* Erkennung der Synthetasen untereinander an. Die Interaktion des Moduls EntB mit EntF bei der Produktion des Siderophors Enterobactin in *Escherichia coli* scheint beispielsweise maßgeblich von hydrophoben Resten in der dritten Helix des EntB-ArCPs abzuhängen [Lai *et al.*, 2006]. Sehr häufig werden allerdings E-Domänen am C-terminalen Ende solcher Synthetasen vorgefunden. Es konnte gezeigt werden, dass solche E-Domänen an der Protein-Protein Interaktion mit dem *downstream* Enzym beteiligt sind [Linne *et al.*, 2003]. Diese Funktion von E-Domänen wurde durch die Interaktion von LgrA und LgrB des linearen Gramicidin-Systems unterstrichen [Kessler *et al.*, 2004], da die in LgrA enthaltene E-Domäne zu einem das achirale Gly aktivierenden Modul gehört und scheinbar inaktiv ist. Inzwischen

konnten Kommunikation vermittelnde Domänen (COM-Domänen) als Hauptelement für die Steuerung dieser Protein-Protein Erkennung identifiziert werden [Hahn & Stachelhaus, 2004]. COM-Domänen werden am C-terminalen Ende der E-Domänensequenz eines Donorenzyms nach dem hoch konservierten Motiv TPSD gefunden, wo sie ca. 20 Aminosäuren umfassen. Entsprechende Gegenstücke an der N-terminalen Sequenz der C-Domäne eines Akzeptorenzyms sind etwa 15 Aminosäuren groß und liegen vor dem konservierten Motiv L(T/S)P(M/L)QEG. Der Austausch von COM-Domänen kann für die gezielte Erzeugung von Interaktionen zwischen Synthetasen eingesetzt werden [Hahn & Stachelhaus, 2006] und wird auch als Werkzeug für Untersuchungen in dieser Arbeit vorgestellt.

#### 2.4.1 Das Minimalsystem TycA/TycB<sub>1</sub>

Das Minimalsystem bestehend aus den ersten beiden Modulen der Tyrocidin-Synthetasen TycA (PheATE) und TycB<sub>1</sub> (ProCAT) stellt ein etabliertes System zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen dar [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Auf Grund seiner Bedeutung für die vorliegende Arbeit soll es hier beschrieben werden.

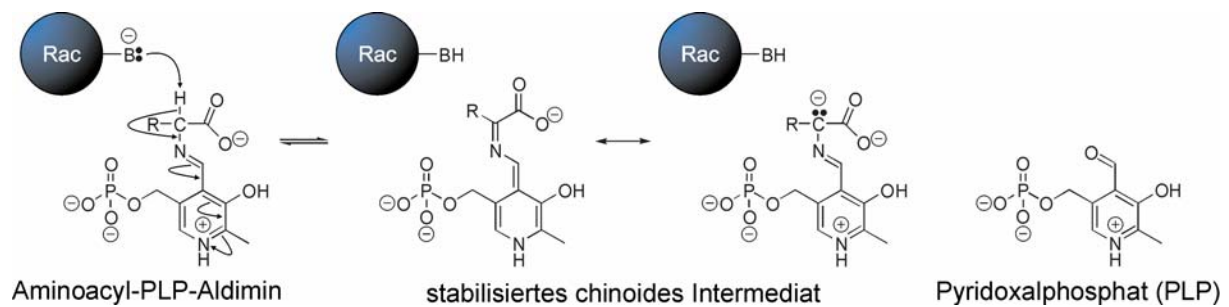


**Abbildung 2-11** Das Minimalsystem TycA/TycB<sub>1</sub>. Bei Inkubation von TycA-ATE und TycB<sub>1</sub>-CAT mit den kognaten Substrataminosäuren entsteht in einem unkatalysierten Freisetzungsschritt das zyklische Dipeptidprodukt DKP.

Die beiden getrennt voneinander vorliegenden Enzyme können *in vitro* mit ihren natürlichen Substrataminosäuren beladen werden. TycA aktiviert, bindet und epimerisiert dabei Phenylalanin, während TycB<sub>1</sub> Prolin aktiviert und bindet. Es wird zum linearen Dipeptid D-Phe-L-Pro kondensiert, worauf die freie Aminogruppe des Phenylalanins das Carbonyl-C-Atom des als Thioester an TycB<sub>1</sub> gebundenen Dipeptids intramolekular nucleophil angreift. In einem unkatalysierten Schritt wird das zyklisierte D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) freigesetzt, und die Proteine sind für den nächsten Reaktionszyklus regeneriert (Abbildung 2-11). Dieses System kann auch für die Abspaltung (längerer) linearer Peptide genutzt werden, wenn TycB<sub>1</sub> dazu C-terminal mit einer Thioesterase verbunden ist. Bei Produktbildungsassays in dieser Arbeit wurde daher das Fusionsprotein TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> [Schwarzer *et al.*, 2001] eingesetzt, da die darin enthaltene Thioesterase des Surfactin-Systems durch ihre hohe Aktivität eine schnelle Produktfreisetzung sichert.

## 2.5 Die Biosynthese von D-Aminosäuren

Im Allgemeinen wird die Inversion der Konfiguration am Chiralitätszentrum C<sub>α</sub> einer einzelnen oder Peptid verknüpften Aminosäure von der L- in die D-Form und umgekehrt durch Racemasen oder Epimerasen katalysiert. Dies geschieht bei allen bekannten Aminosäureracemasen in einer Gleichgewichtsreaktion durch De- und Reprotonierung am C<sub>α</sub>-Atom [Tanner, 2001; Yoshimura & Esaki, 2003]. Jedoch ist die Abstraktion des H-Atoms an C<sub>α</sub> auf Grund seiner äußerst geringen Acidität (pK<sub>a</sub> ~ 21 in der protonierten und ~ 29 in der zwitterionischen Form) deutlich erschwert [Richard & Amyes, 2001; 2004]. Die meisten Racemasen katalysieren diese Reaktion daher ähnlich wie Aminotransferasen, Decarboxylasen oder Aldolasen mit Hilfe der über einen spezifischen Lysinrest im aktiven Zentrum des Enzyms als Aldimin gebundenen prosthetischen Gruppe Pyridoxalphosphat (PLP) [Stryer, 1999]. Dabei wird das Aminosäuresubstrat unter Bildung eines externen Aldimins (*Schiff-Base*) über seine Aminogruppe an der Aldehyd-Funktion des PLP gebunden. Die Deprotonierung der Aminosäure am C<sub>α</sub> wird dadurch erleichtert, dass das PLP in seiner protonierten Form als Elektronenfalle wirkt (elektrophiler Katalysator). Elektronen werden vom Substrat in den aromatischen Ring abgezogen, wodurch das negativ geladene Reaktionsintermediat der Katalyse mesomer stabilisiert wird (Abbildung 2-12). Nach erfolgter Reprotonierung wird das Reaktionsprodukt durch Hydrolyse des Aldimins freigesetzt.

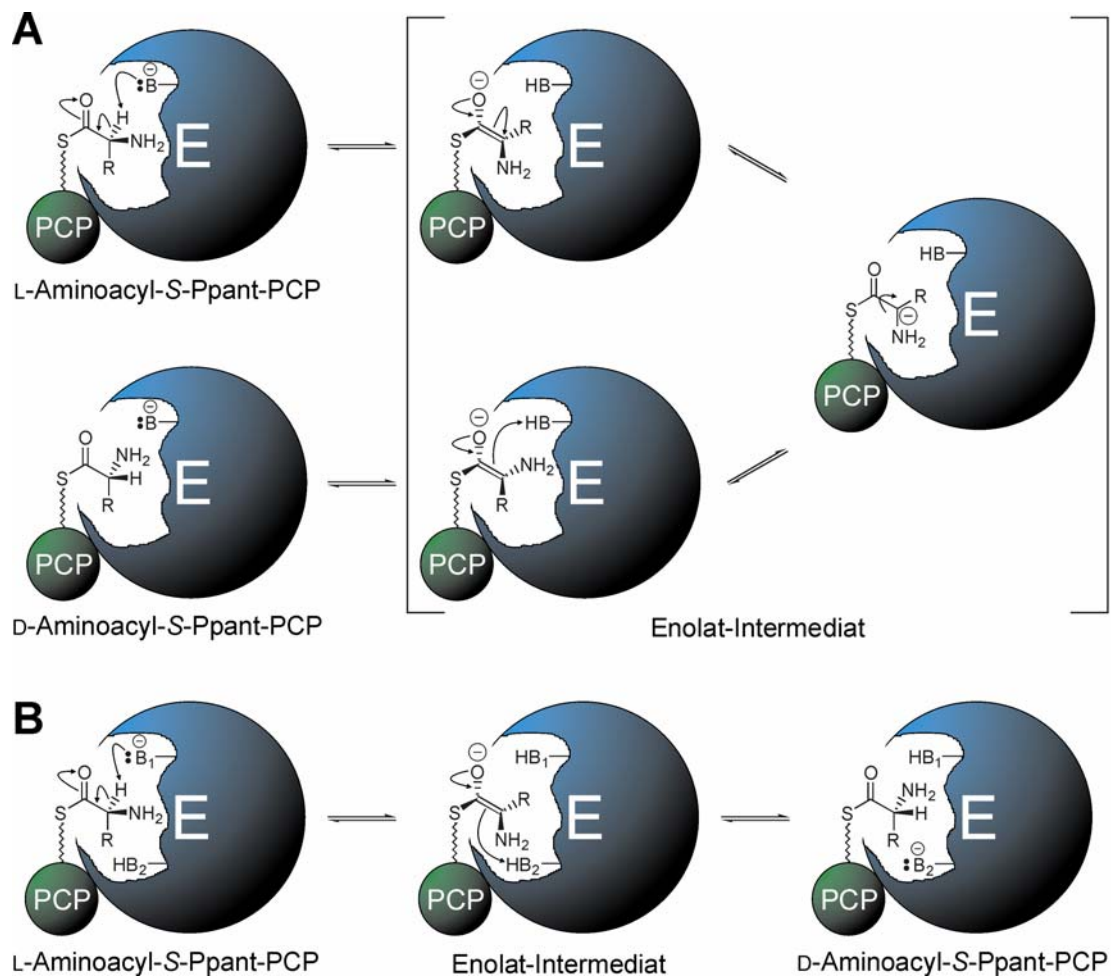


**Abbildung 2-12** Mechanismus von PLP-abhängigen Racemasen. Nach Bildung eines Aldimins zwischen PLP-Kofaktor und Substrataminosäure wird die Deprotonierung am  $C_{\alpha}$ -Atom durch mesomere Stabilisierung des anionischen Reaktionsintermediats erleichtert.

Eine Reihe von Racemasen hingegen nutzt diesen Kofaktor nicht für die Katalyse der Reaktion. Beispiele für PLP unabhängige Enzyme sind die Aspartat- [Higgins *et al.*, 1989], Glutamat- [Glavas & Tanner, 2001; Ruzheinikov *et al.*, 2005], Prolin- [Fischer *et al.*, 1986; Buschiazzo *et al.*, 2006] und Diaminopimelat- [Cirilli *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 2006] Racemasen. Die für die drei zuletzt genannten Enzyme jüngst gewonnen Strukturdaten zeigten im katalytischen Zentrum zwei für die Reaktion entscheidende Cysteinreste. Einer der beiden Reste wirkt in deprotonierter Thiolat-Form bei der Reaktion als Base und abstrahiert das Proton vom  $C_{\alpha}$ -Atom der Substrataminosäure, während die Sulfhydrylgruppe des zweiten Cysteinrestes die Reprotonierung vornimmt (Zwei-Basen-Mechanismus). Besondere strukturelle Eigenschaften der aus zwei ähnlichen  $\alpha/\beta$ -Domänen aufgebauten Racemasen ermöglichen dabei diese Art des Mechanismus. Zwei  $\alpha$ -Helices, an deren N-Termini sich die aktiven Cys-Reste befinden, weisen auf das aktive Zentrum und bilden entgegengesetzte, Elektronen ziehende Dipolmomente aus. Eine Konformationsänderung des Enzyms bei Bindung des Substrats verdrängt Wasser aus der katalytischen Tasche und erhöht zusätzlich die Basizität des aktiven Thiolats, während das Substrat durch eine intensive Koordination über Wasserstoffbindungen speziell an der Carboxylat-Funktion starr gehalten und der Enolat-Übergangszustand durch eine optimale Orbitalüberlappung mesomer stabilisiert wird.

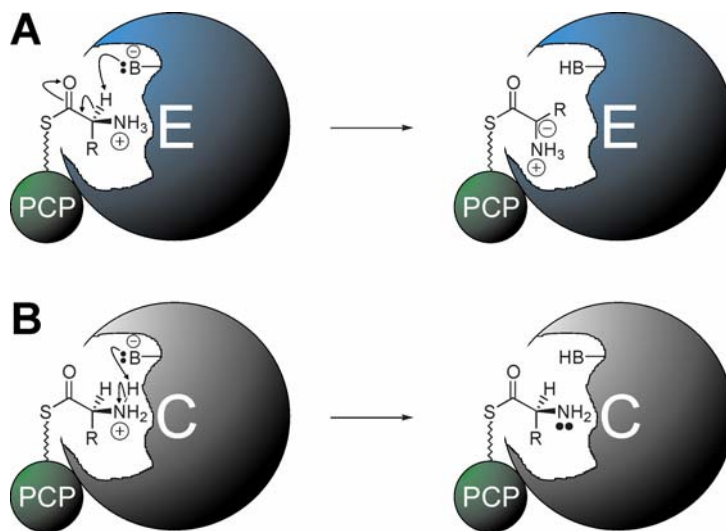
Dass die in nichtribosomalen Peptidsynthetase-Clustern vorkommenden E-Domänen ihre eigene Klasse von Epimerasen bilden, kann man aus nicht vorhandenen Homologien beim Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen Epimerasen bzw. Racemasen ableiten [Marahiel *et al.*, 1997]. Auch scheinen sie sich keiner prosthetischen Gruppe wie PLP [Galakatos & Walsh, 1987; Gallo *et al.*, 1993] bei der Reaktionskatalyse zu bedienen. Auf Grund des Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese stellen nicht freie Aminosäuren, sondern über den Ppant-Arm an die T-Domäne gebundene Aminoacyl- oder Peptidylintermediate die Substrate für E-Domänen dar. Trotz einer umfangreichen

Mutationsstudie [Stachelhaus & Walsh, 2000] werden nach wie vor der Ein- und der Zwei-Basen-Mechanismus (Abbildung 2-13) diskutiert. Trotzdem scheint der im *core*-Motiv E2 (His-Motiv) [HHxISDG(WV)S] (s. Anhang) enthaltene zweite Histidinrest für die Katalyse von Bedeutung zu sein. Auch in C-Domänen, die das gleiche *core*-Motiv (hier C3) aufweisen, scheint dieser His-Rest für die Deprotonierung von großer Bedeutung zu sein [de Crécy-Lagard *et al.*, 1995; Bergendahl *et al.*, 2002].



**Abbildung 2-13** Alternative diskutierte Mechanismen für E-Domänen. (A) Beim Ein-Basen-Mechanismus werden De- und Reprotonierung von nur einem katalytischen Rest übernommen. Die Inversion am C<sub>α</sub>-Atom des Substrats nach Reprotonierung ist dabei nur möglich, wenn das Enzym eine Koformationsumwandlung erfährt, Wasser als Protonendonator dient oder wie dargestellt am Enolat-Intermediat auf Stufe des Carbanions eine Rotation um die C-C-Achse erfolgt. Da die Enol-Form starr planar ist, kann auf dieser Ebene keine Rotation stattfinden. (B) Beim Zwei-Basen-Mechanismus befindet sich ein Paar von katalytischen Resten [B(ase)<sub>1</sub> und B(ase)<sub>2</sub>] im Aktiven Zentrum des Enzyms. Während eine Base (hier B<sub>1</sub>) die Deprotonierung vornimmt, erfolgt die Reprotonierung durch die andere in Form der konjugierten Säure vorliegenden Base (hier B<sub>2</sub>) vom anderen Halbraum der Enolat C=C-Doppelbindung des Reaktionsintermediats.

Interessanterweise tauchen diese *core*-Motive auch zweimal in C/E-Domänen auf [Balibar *et al.*, 2005]. Anders als bei der von der E-Domäne katalysierten Epimerisierung, bei der die Deprotonierung des C $_{\alpha}$ -Atoms erfolgen muss, kann für die durch die C-Domäne katalysierte Peptidkondensation eine Deprotonierung der Aminogruppe zur Erhöhung der Nucleophilie von Vorteil sein (Abbildung 2-14).



**Abbildung 2-14** Sowohl E- als auch C-Domänen enthalten das His-Motiv mit dem jeweils aktiven zweiten His-Rest. (A) Bei E-Domänen übernimmt diese Base im *core* E2 vermutlich die Deprotonierung des C $_{\alpha}$ -Atoms eines enzymgebundenen Substrats. (B) Bei C-Domänen scheint dieser Rest im *core* C3 die Aminogruppe eines Aminoacyl-Substrats zur Erhöhung der Nucleophilie zu deprotonieren.

Es bleibt abzuwarten, ob die Lösung der Kristallstruktur einer E-Domäne endgültigen Aufschluss über die katalytischen Mechanismen der Inversionsreaktion geben kann.

## 2.6 D-Aminosäuren in nichtribosomal synthetisierten Peptiden

Obwohl die Inversion eines C $_{\alpha}$ -Stereozenentrums eine scheinbar einfache Modifikation darstellt, leisten D-Aminosäuren einen wichtigen Beitrag für die Extensität der biologischen Wirkung zahlreicher nichtribosomal assemblierter Peptide [Marahiel *et al.*, 1997]. Vermutlich machen sie das Produkt, in das sie inkorporiert worden sind, weniger anfällig für einen proteolytischen Abbau, da Proteasen in der Regel nur an zwischen L-Aminosäuren geknüpften Peptidbindungen aktiv sind. Hinzukommend bedeutet der Einbau einer D-Aminosäure aus stereochemischer Sicht das Entstehen eines diastereomeren Derivats, wodurch das Produkt völlig neue sowohl chemische als auch physikalische Eigenschaften sowie ein breiteres Wirkungsspektrum erhalten kann.

Bei der nichtribosomalen Peptidsynthese existiert zum Einbau dieser seltenen Polypeptidbausteine prinzipiell zum einen die Möglichkeit der Integration durch modulinterne Domänen (am häufigsten E-Domänen), die enzymgebundene L-Aminoacyl-Substrate epimerisierten [Pfeifer *et al.*, 1995]. Die  $^{\text{D}}\text{C}_L$ -Domäne des entsprechend nachfolgenden

Moduls übernimmt darauf die Selektion der aus der Gleichgewichtsreaktion [Stachelhaus & Walsh, 2000] hervorgehenden D-Stereomere über ihre putative Donorbindungsseite [Belshaw *et al.*, 1999; Clugston *et al.*, 2003] (s. 2.5.5.1). Alternativ invertieren externe Racemasen Aminosäuren von der L- in die D-Form [Hoffmann *et al.*, 1994; Cheng & Walton, 2000], worauf die Aktivierung durch enantioselektive A-Domänen stattfindet [Weber *et al.*, 1994].

Die Epimerisierung von Aminosäuren durch E-Domänen ist häufiger in bakteriellen NRPS-Systemen vorzufinden [Konz *et al.*, 1997; 1999; Mootz & Marahiel, 1997; Tosato *et al.*, 1997]. Bei fungalen NRPS hingegen ist scheinbar letztere der beiden genannten Varianten zum Einbau epimerisierter Aminosäurebausteine in das Peptid die Regel [Weber *et al.*, 1994], jedoch lassen sich hierfür auch Ausnahmen finden. So ist beispielsweise in der fungalen ACV-Synthetase von *Penicillium chrysogenum* – dem Biosynthesesystem des Penicillin-Vorläufers – eine E-Domäne vorhanden [Aharonowitz *et al.*, 1993; Byford *et al.*, 1997] und im bakteriellen Syringomycin Synthetase-Cluster aus *Pseudomonas syringae* konnten selektiv D-Aminosäuren aktivierende A-Domänen entdeckt werden [Guenzi *et al.*, 1998]. Eine besondere Ausnahme stellt das für die Synthese von HC-Toxin verantwortliche fungale NRPS-System aus *Cochliobolus carbonum* dar, in dem beide Möglichkeiten zur Inkorporation epimerisierter Aminosäuren genutzt werden [Scott-Craig *et al.*, 1992; Cheng & Walton, 2000].

## 2.7 Aufgabenstellung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf die Substratspezifität und Funktionalität von E-Domänen. Um verschiedene E-Domänen mit einer möglichst großen Vielfalt an Substraten testen zu können, sollte ein geeignetes chemoenzymatisches Minimalsystem entwickelt werden, das die Verwendung von CoA-Derivaten in Kombination mit der promiskuitiven Ppant-Transferase Sfp zur Fehlmodifikation von PCPs zulässt. Entsprechend synthetisierte Peptidyl-CoAs sollten dann Aufschluss über die Substrattoleranz von E-Domänen und mögliche Erkennungsstellen im Substrat liefern. Somit sollte zum einen geklärt werden, ob auf Ebene der Selektivität ein Unterschied zwischen Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domänen besteht. Zum anderen sollte sich das System zur Untersuchung der Toleranz einer C-Domäne, die natürlicherweise auf ein Initiationsmodul folgt, gegenüber Peptidyl-Substraten erweitern lassen.

Zur Beantwortung der Frage nach einem funktionellen Unterschied zwischen E-Domänen aus Initiations- und solchen aus Elongationsmodulen sollten die Folgen eines E-

Domänen austauschs in dimodularen Modellsynthetasen aus dem Tyrocidin-System evaluiert werden. Dabei galt es, eine auf Massenspektrometrie basierende direkte Untersuchung von enzymgebunden Reaktionsintermediaten zu entwickeln und die Resultate in einem weiteren *in vitro* Ansatz zu verifizieren.



## 3 Material

### 3.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien, die nicht in Tabelle 3-1 aufgeführt sind, wurden als Standardprodukte bei namhaften Herstellern in p. a.-Qualität bezogen.

**Tabelle 3-1** Benutzte Chemikalien, Enzyme und Kits

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Aldrich (Steinheim)	verschiedene Standardchemikalien
Amersham Biosciences (jetzt Teil von GE Healthcare, Freiburg)	Ampicillin, Kanamycin, IPTG, Hefeextrakt, RNase A, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Filtrationssäulchen AutoSeq™ G-50
AppliChem (Darmstadt)	Hefeextrakt, Trypton, IPTG
Applied Biosystems (Weiterstadt)	ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0
Bachem Biosciences (Weil am Rhein)	N <sub>α</sub> -Fmoc- und Boc-geschützte Aminosäuren
Difco (Detroit, USA)	Hefeextrakt
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
Fluka (Neu Ulm)	TEMED, SDS
IRIS Biotech (Marktreidwitz)	2-Chlorotriethyl-Harz, Kupplungsreagenzien (HBTU, HOBt)
Macherey & Nagel (Düren)	Nucleospin Extract Kit
Merck (Darmstadt)	verschiedene Feinchemikalien
Millipore (Schwalbach)	Amicon Ultra-15-Konzentratoren
MP-Biomedicals (Eschwege)	Coenzym A (Trilitium-Salz)
MWG Biotech (Ebersberg)	synthetische Oligonucleotide
NEB – New England Biolabs (Frankfurt am Main)	Desoxyribonucleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), Restriktionsendonucleasen, <i>prestained</i> Protein Molmarker, T4 DNA Ligase, Puffer
Novabiochem (Darmstadt)	N <sub>α</sub> -Fmoc- und Boc-geschützte Aminosäuren, PyBOP
Oxoid (Wesel)	Agar Nr.1, Trypton
PeQLab (Erlangen)	<i>prestained</i> Protein Molmarker
Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)	Fluorescein-5-maleimid
Promega (Mannheim)	Sequencing Grade Modified Trypsin
Qiagen (Hilden)	QIAquick-spin PCR Purifikation Kit, QIA-quick Gel Extraction Kit, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose, QIAexpress Vektor Kit ATG
Qiagen-Operon (Köln)	synthetische Oligonucleotide

Roche (Mannheim)	Expand™ Long Template PCR System
Roth (Karlsruhe)	EtBr, $\beta$ -Mercaptoethanol, Acrylamid-Lösung für SDS-PAGE, Rotiszint Eco Plus
Schleicher & Schüll (Dassel)	Sterilfilter (Porengröße 0.45 und 0.2 $\mu$ m)
Serva (Heidelberg)	Bromphenolblau, Xylencyanol
Sigma (Deisenhofen)	verschiedene Standardchemikalien

### 3.2 Geräte

Bei Geräten, die nicht in Tabelle 3-2 aufgeführt sind, handelt es sich um Standardmodelle üblicher, bekannter Laborgerätehersteller.

**Tabelle 3-2** Verwendete Geräte, deren Typenbezeichnung und Hersteller

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i>
DNA-Agarosegel-Dokumentation	<i>Cybertech CS 1 Videokamera</i>
DNA-Sequenzier-System	<i>Mitsubishi Video Copy Processor</i> Thermodrucker
DNA-Sequenzier-System	<i>Perkin Elmer/PE Applied Biosystems</i> ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Elektroporations-Pulser	<i>Bio-Rad</i> Gene Pulser und Pulse-Controller
ESI-FTICR und ESI-MS <sup>2</sup>	<i>Thermo Electron. Corp.</i> Finnigan-LTQ
ESI-TOF	<i>Applied Biosystems</i> Qstar Pulsar I
FPLC-System	<i>Amersham Pharmacia</i> Äkta™ Prime, Äkta™ Purifier
French Press	<i>SLM Aminco</i> French-Pressure Cell Press <i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5
French Press-Zelle	<i>SLM Aminco</i> French-Pressure Cell-Version 5.1 <i>Thermo Spectronic</i> Standard Cell 40 KP
Heizschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
HPLC-(MS-)System	<i>Agilent/Hewlett Packard</i> Series 1100 HPLC-System mit DAD-Detektor, FLD-Detektor, MSD-Detektor Vakuumengaser, quaternärer Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor und HP-Chemstation Software
HPLC-Trennsäulen	<i>Macherey &amp; Nagel</i> VP 250/21 Nucleodur 100–5 C18ec, CC 250/2 Nucleodur C18 Pyramid (5 $\mu$ m) und 125/2 Nucleodur C8 (3 $\mu$ m) <i>Phenomenex</i> 150 $\times$ 2 mm Jupiter C4 (5 $\mu$ m) <i>Merck</i> LiChro-CART 250–4 ChiraDex Gamma (5 $\mu$ m)

Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25 Incubator Shaker und Innova 4300 Incubator Shaker <i>Infors</i> Multitron® Version 2
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> Flex III
Peptid-Synthesizer	<i>Advanced ChemTech</i> APEX 396 Synthesizer
Photometer	<i>Pharmacia Biotech</i> Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN
Speed-Vac	<i>Eppendorf</i> Concentrator 5301 <i>Savant</i> Speed Vac Concentrator <i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Thermo-Cycler	<i>Perkin Elmer/PE Applied Biosystems</i> Gene Amp PCR System 2400, Gene Amp PCR System 9600 und Thermal Cycler 480 <i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
Zentrifugen	<i>Heraeus</i> Biofuge pico, Mikrofuge RF und Megafuge 1.0R <i>Sorvall</i> RC 26 Plus und RC 5B Plus mit Rotoren SS-34 und SLA-3000

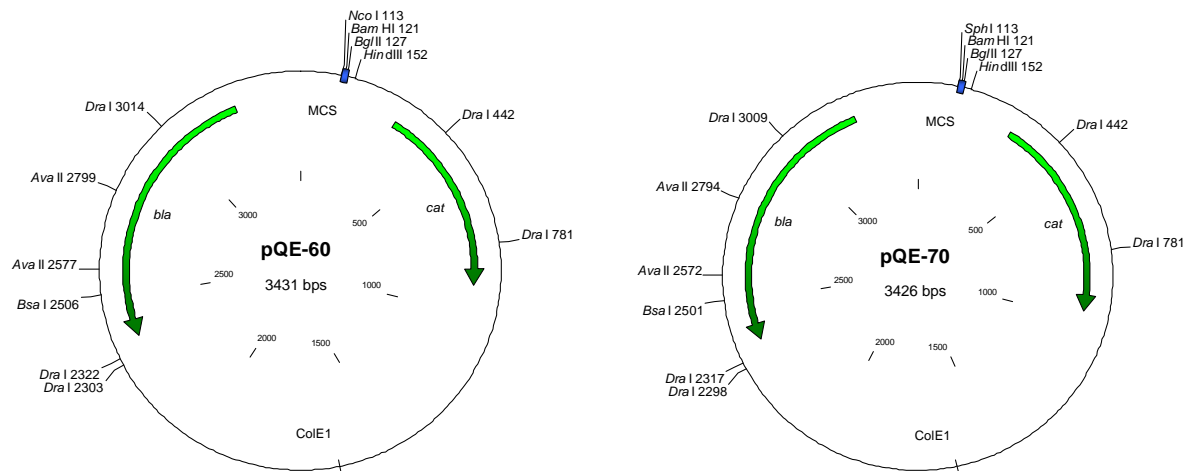
### 3.3 Vektoren

#### 3.3.1 pQE60 und pQE70

Die zur Familie der pDS-Plasmide [Bujard *et al.*, 1987] gehörenden Vektoren pQE60 (3431 bp) und pQE70 (3426 bp) (s. Abbildung 3-1) des Expressionssystems *QIAexpressionist* (Qiagen) leiten sich vom Plasmid pDS56/RBSII [Stüber *et al.*, 1990] ab und wurden als Standardvektoren für das Klonieren und Exprimieren aller in dieser Arbeit verwendeten Peptidsynthetase-Gene genutzt. Neben ihrer geringen Größendifferenz unterscheiden sich die beiden Vektoren lediglich in ihrer MCS (*multiple cloning site*).

Sie besitzen den Promotor P<sub>N25</sub> [Gentz & Bujard, 1985] des Phagen T5, der von der RNA-Polymerase in *E. coli* erkannt wird, und zwei *lac*-Operatorsequenzen zur verbesserten Bindung des *lac*-Repressors sowie zur sichergestellten Repression des T5-Promotors. Ihre synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII ist auf hohe Translationsraten in *E. coli* ausgerichtet. Ferner ist eine für den His<sub>6</sub>-tag kodierende Sequenz enthalten, so dass *in frame* in die MCS ligierte Gene nach der Expression zu C-terminal mit sechs zusätzlichen Histidinen ausgestatteten rekombinanten Proteinen führen, die dann leicht über IMAC-Chromatographie (s. 4.2.3.1) aufgereinigt werden können. Es sind translationale Stopcodons in allen Leserastern und zwei starke Transkriptionsterminatoren – *t<sub>0</sub>* des Phagen λ [Schwarz *et al.*, 1987] und T1 des *rrnB*-Operons aus *E. coli* – vorhanden. Expression des für β-Lactamase kodierenden Gens *bla* verleiht den eines der Plasmide tragenden Bakterien eine

Ampicillinresistenz [Sutcliffe, 1979] bis zu einer Endkonzentration von  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; das Chloramphenicolacetyltransferase-Gen (*cat*) zwischen  $t_0$  und T1 wird nicht exprimiert. Replikation in *E. coli* erfolgt über den Replikationsursprung ColE1 aus pBR322 [Sutcliffe, 1979].



**Abbildung 3-1** Physikalische Karten der Expressionsvektoren pQE60 und pQE70. Eingezeichnet sind die Gene *bla* und *cat*, der Replikationsursprung ColE1, sowie die MCS mit den entsprechenden zu Klonierungszwecken eingerichteten Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen. Unterschiede zwischen den beiden Vektoren bestehen in der Gesamtgröße und einer veränderten Schnittstelle in der MCS.

Die MCS des pQE60 enthält Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *NcoI*, *BamHI* und *BglII*, die des pQE70 für *SphI*, *BamHI* und *BglII*, wobei die in den Erkennungssequenzen von *NcoI* bzw. *SphI* enthaltenen ATGs als Startcodons dienen.

Da die Expression der gewünschten Gene über die *lac*-Operatoren reprimiert werden kann, wurde immer in Gegenwart des Plasmids pREP4 (s. 3.3.2), das ein für den *lac*-Repressor kodierendes Gen enthält, exprimiert. Die Zugabe von IPTG bewirkt dann eine Konformationsänderung des *lac*-Repressors, der daraufhin vom *lac*-Operator abdissoziiert, und somit eine Induktion der Expression.

### 3.3.2 pREP4

Das vom pACYC abgeleitete Plasmid pREP4 (3740 bp) (s. Abbildung 3-2) enthält den Replikationsursprung p15A und ist damit kompatibel mit allen Plasmiden, die den ColE1 Replikationsursprung tragen.



### 3.4.3 *E. coli* M15

Der sich vom *E. coli* Stamm K12 ableitende Stamm *E. coli* M15 gehört zu den für das Expressionssystem *QIAexpressionist* der Firma Qiagen (Hilden) empfohlenen Expressionsstämmen und weist folgenden Genotyp auf [Zamenhof & Villarejo, 1972]: *nal<sup>S</sup>*, *str<sup>S</sup>*, *rif<sup>S</sup>*, *lac*, *ara*, *gal*, *mtl*, *F<sup>+</sup>*.

### 3.4.4 *E. coli* SG13009

Dieser sich ebenfalls vom *E. coli* Stamm K12 ableitende Expressionsstamm *E. coli* SG13009 [Gottesman *et al.*, 1981] gehört auch zu den für das Expressionssystem *QIAexpressionist* (Qiagen) empfohlenen und wurde alternativ zu *E. coli* M15 verwendet. Sein Phänotyp ist mit dem von *E. coli* M15 identisch und sieht wie folgt aus: *Nal<sup>S</sup>*, *Str<sup>S</sup>*, *Rif<sup>S</sup>*, *Thi<sup>-</sup>*, *Lac<sup>-</sup>*, *Ara<sup>+</sup>*, *Gal<sup>+</sup>*, *Mtl<sup>-</sup>*, *F<sup>-</sup>*, *RecA<sup>+</sup>*, *Uvr<sup>+</sup>*, *Lon<sup>+</sup>*.

## 3.5 Medien

Zur Anzucht von *E. coli* Stämmen wurde LB-Medium verwendet.

<b>LB-Medium</b>	16 g l <sup>-1</sup>	Bactotrypton
	10 g l <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
	5 g l <sup>-1</sup>	NaCl

Für Expressionen hingegen diente ausschließlich 2YT-Vollmedium [Brown, 1991], dem zur Löslichkeitssteigerung der rekombinanten NRPS-Proteine in Expressionsansätzen Mg<sup>2+</sup>-Ionen einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt wurden. Zusätzlich wurde zu dem Medium nach dem Autoklavieren Natriumcitrat in Form einer sterilen Lösung (1 M) zu einer Endkonzentration von 20 mM gegeben, was die Bakterienzellen während der Expression vor einer Phageninfektion schützen sollte.

<b>2YT-Expressionsmedium</b>	16 g l <sup>-1</sup>	Bactotrypton
	10 g l <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
	5 g l <sup>-1</sup>	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	Natriumcitrat

Sollten Kulturplatten hergestellt werden, wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v) Agar Nr.1 zugesetzt. Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch zur

Sterilisation 20 min bei 121 °C und 1.5 bar autoklaviert. Die zur Selektion dienenden hitzeempfindlichen Antibiotika wurden den Medien im Bedarfsfall in Form von steril-filtrierte Lösungen bei einer Temperatur < 60 °C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt.

<b>Antibiotikazusätze</b>	100 µg ml <sup>-1</sup>	Ampicillin
	25 µg ml <sup>-1</sup>	Kanamycin

## 4 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Techniken sind zum Großteil etablierte und in Standardwerken der Molekularbiologie und Biochemie [Sambrook *et al.*, 1989] beschriebene Verfahren. Daher wird im Methodenteil lediglich auf die Techniken, die sich wesentlich von den Standardverfahren unterscheiden, und auf die Konstruktion der rekombinanten Plasmide genauer eingegangen.

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

Zur Amplifikation von für Klonierungen benötigten DNA-Fragmenten diente die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987] unter Verwendung des *Expand™ Long Template PCR System* der Firma Roche (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Die bei der PCR benutzten synthetischen Oligonucleotide (Primer) wurden von Qiagen-Operon (Köln) bezogen und waren in der Regel so gewählt worden, dass sie Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen einführten. DNA wurde nach dem Prinzip von Vogelstein [Vogelstein & Gillespie, 1979] mit Hilfe eines *QIAquick™ Spin PCR Purification Kit*, *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) oder *Nucleospin Extract Kit* (Macherey & Nagel, Düren) aufgereinigt. Restriktionsenzyme und T4-DNA-Ligase der Firma NEB (New England Biolabs, Schwalbach) wurden nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Pufferlösungen verwendet. Plasmide wurden aus *E. coli* Zellen auf Grundlage der alkalischen Lyse [Birnboim & Doly, 1979] präpariert. Eine Verifikation rekombinanter Plasmide erfolgte durch Restriktionsverdaue und DNA-Sequenzanalyse (s. 4.1.2).

#### 4.1.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide

Alle Konstrukte, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, basieren auf dem pQE-Vektorsystem (s. 3.3.1) der Firma Qiagen. Zur Klonierung und Präparation der Plasmide dienten die *E. coli* Stämme XL1 Blue und XL10 Gold der Firma Stratagene (Heidelberg). Bei der Angabe der für die PCR verwendeten Oligonucleotide sind die Sequenzen, die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme darstellen, in fetter Schrift hervorgehoben. Die für die dimodularen Systeme verwendete Nomenklatur wird in Abschnitt 5.3.1 erläutert.



#### 4.1.1.1 Plasmide zur Expression der PCP-E-Domänen

**Konstruktion von pQE60-tycA-PCP-E:** Die Klonierung dieses Plasmids wurde bereits beschrieben [Linne *et al.*, 2001].

**Konstruktion von pQE60-grsA-PCP-E:** Der für GrsA-PCP-E kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-ATT CCA TGG GGG TAG ACT ATG AAG C-3' und 5'-ATA GGA TCC CGT TAA TGA ATC GGC CAA C-3' aus chromosomaler DNA von *Bacillus brevis* ATCC 9999 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut worden war, wurde es in einen gleichermaßen geschnittenen pQE60-Vektor gerichtet ligiert.

**Konstruktion von pQE70-tycB<sub>3</sub>-PCP-E:** Der für TycB<sub>3</sub>-PCP-E kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-AAT TAA GCA TGC TTG CAG CGC CGC AAA CCG-3' und 5'-AAT TTT AGA TCT AAT CCA TTC CAG GAT GTT TTC C-3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *Sph*I und *Bgl*II verdaut worden war, wurde es in einen analog geöffneten pQE70-Vektor gerichtet ligiert.

**Konstruktion von pQE60-fenD<sub>2</sub>-PCP-E:** Als Templat für die Amplifikation des FenD<sub>2</sub>-PCP-E kodierenden Genabschnitts mit den Primern 5'-TTA AAA CCA TGG ATA TCA GCC CTA GAA ATG AG-3' und 5'-AAA AAA GGA TCC TAG TTT GTT GAC GGC CCC-3' wurde das Cosmid pFC6A5 [Lin *et al.*, 1999] eingesetzt. Das PCR-Amplifikat wurde mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut, worauf es in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen pQE60-Vektor gerichtet ligiert wurde.

#### 4.1.1.2 Plasmide zur Expression der dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Derivate

**Konstruktion von pQE70-tycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE:** Die Klonierung dieses Plasmids, das für das als TycB<sub>2-3</sub>-Wildtyp bezeichnete Protein kodiert, wurde bereits beschrieben [Linne & Marahiel, 2000].

**Konstruktion von pQE70-tycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub>:** Bei diesem Konstrukt wurde der für die TycB<sub>3</sub>-E-Domäne kodierende DNA-Abschnitt gegen den entsprechenden von TycA ersetzt. Die Klonierung dieses für das E-Domänen-Austausch-Protein kodierenden Plasmids wurde bereits beschrieben [Linne, 2001].

**Konstruktion von pQE70-tycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub>:** Bei diesem Konstrukt wurde der für die TycB<sub>3</sub>-COM-Domäne kodierende DNA-Abschnitt gegen den entsprechenden von TycA ersetzt. Hierzu wurde ein für TycB<sub>3</sub>-PCP-E/COM<sub>tycA</sub> kodierender Genabschnitt mit den Primern 5'-AAT TAA GCA TGC TTG CAG CGC CGC AAA CCG-3' und 5'-TTT TAT GGA TCC GCG CAG TGT ATT TGC AAG C-3' aus dem Plasmid pTrcHis-TOPO-tycB<sub>3</sub>-ATE/COM<sub>tycA</sub> (s. 4.1.1.3) amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *Pml*I und *Bam*HI verdaut und in ein identisch geschnittenes Plasmid pQE70-tycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE gerichtet ligiert.

#### 4.1.1.3 Weitere Plasmide

**Konstruktion von pQE60-tycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>:** Die Klonierung dieses Plasmids wurde bereits beschrieben [Schwarzer *et al.*, 2001].

**Konstruktion von pTrcHis-TOPO-tycB<sub>3</sub>-ATE/COM<sub>tycA</sub>:** Die Klonierung dieses Plasmids wurde bereits beschrieben [Hahn & Stachelhaus, 2004].

#### 4.1.2 DNA-Sequenzierung

Als analytische Methode zur Verifizierung der konstruierten rekombinanten Plasmide wurde eine DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren von Sanger [Sanger *et al.*, 1977] durchgeführt. Bei der dazu erforderlichen PCR wurde das *ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0* (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Sequenzanalyse nach automatischer Kapillarelektrophorese der Abbruchfragmente erfolgte dann an einem *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* der Firma Applied Biosystems gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Alternativ wurden Plasmidlösungen einer Konzentration von 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  an die mit der Sequenzierung beauftragten Firma GATC Biotech (Konstanz) gesendet.

### 4.2 Proteinchemische Methoden

Etablierte proteinchemische Methoden wurden wie beschrieben durchgeführt. Dazu zählt vor allem die Proteinanalytik durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] und die anschließende Färbung der SDS-Gele mit Coomassie Brilliant Blue R250 [Bennett & Scott, 1971].

### 4.2.1 Genexpression im pQE-Vektor-System

Zur Herstellung heterologer Proteine in *E. coli* wurden die entsprechend in einen pQE60- oder pQE70-Vektor klonierten NRPS-Gene mit Hilfe des Expressionssystems *QIAexpressionist* der Firma Qiagen exprimiert. Die verwendeten Expressionstämme *E. coli* M15/pREP4 oder SG13009/pREP4 (s. 3.4.3 und 3.4.4) [beide Stämme trugen bereits das Plasmid pREP4 (s. 3.3.2)] wurden zu diesem Zweck mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert. Die Verwendung des pQE-Systems für die Erzeugung rekombinanter Proteine bot zum einen den Vorteil, dass die Genexpression durch den IPTG-induzierbaren T5-Promotor kontrolliert werden konnte, und zum anderen, dass zugleich ein C-terminaler His<sub>6</sub>-tag angefügt wurde, der eine direkte Aufreinigung per IMAC-Affinitätschromatographie an einer FPLC-Anlage (s. 4.2.3) erlaubt.

Für die Expression standen generell zwei verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. In jedem Fall wurden zunächst 400 ml vorgewärmtes 2YT-Medium (Amp<sup>100</sup>, Kan<sup>25</sup>) 1 : 100 mit einer Vorkultur des entsprechenden Produzentenstammes inokuliert.

Zum Fortfahren nach der ersten Variante wurden die Kulturen in einem Luftschüttler bei 37 °C und 250 Upm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.3 angezogen. Die Temperatur wurde auf 30 °C gesenkt und die Kultur nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6–0.8 zur Induktion der Expression mit 200 µl einer IPTG-Lösung (400 mM, 0.2 mM Endkonzentration) versetzt.

Beim Vorgehen nach der zweiten Variante wurden die Expressionskulturen direkt nach der Inokulation über Nacht für 16–18 h ohne Induktion bei einer Temperatur von etwa 25 °C und 250 Upm inkubiert, wonach 200 µl IPTG-Lösung (s. o.) zugegeben wurden.

Nach der Induktion wurde in beiden Fällen für weitere 2–5 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation der dichten Suspensionen (7000 Upm bei 4 °C) für 10 min pelletiert und in 10 ml FPLC-Puffer A (s. 4.2.3) resuspendiert. Wurden diese Suspensionen nicht direkt zum Zellaufschluss weiterverwendet, konnten sie bei –20 °C zur späteren Aufarbeitung gelagert werden.

Über SDS-PAGE konnte die Proteinproduktion und somit der Erfolg einer Expression verfolgt werden, was durch den Vergleich von vor und nach der Induktion mit IPTG entnommenen Proben geschah. Auf diese Weise gelang es zugleich, probate Produzentenstämme zu isolieren. In der Regel lieferte die Genexpression nach der zweiten Möglichkeit vor allem bei den größeren Konstrukten höhere Mengen an löslichem und aktivem Protein.

### 4.2.2 Zellaufschluss

Resuspendierte *E. coli*-Zellen wurden an einem *French-Press*-System (SLM Aminco oder Avestin) aufgeschlossen. In einer entsprechenden Vorrichtung wurde die Zellsuspension dabei unter einen hohen Druck von ungefähr 1000 psig gesetzt und darauf durch ein Ventil kontrolliert nur über einen engen Auslass möglichst tropfenweise zum Abfließen gebracht. Die durch den fulminanten Druckabfall beim Austreten hervorgerufene Expansion bewirkt ein Aufreißen der Zellwände und Zellmembranen, wodurch alle intrazellulären Bestandteile freigesetzt werden. Mit dem Durchführen der gesamten Behandlung bei 4 °C sollten die rekombinanten Proteine geschont werden. Für einen möglichst quantitativen Zellaufschluss wurden drei Zyklen von Kompression und Dekompression durchlaufen. Durch Zentrifugation (17000 Upm bei 4 °C) für 30 min wurde das Rohlysat von unlöslichen Bestandteilen befreit, worauf der leicht gelb gefärbte Überstand direkt zur Aufreinigung über IMAC (s. 4.2.3) verwendet werden konnte.

### 4.2.3 Proteinreinigung per IMAC-Affinitätschromatographie

Da alle im Rahmen dieser Arbeit generierten rekombinanten Proteine durch die Expression in einem pQE-Vektor mit einem C-terminalen Hexahistidin- ( $\text{His}_6$ -) *tag* versehen waren, gelang ihre Aufreinigung durch die Methode der Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC – *immobilized metall ion ligant affinity chromatography*) besonders schnell und effizient [Hochuli *et al.*, 1987; 1988; 1989]. Dabei chelatisieren Histidinreste des  $\text{His}_6$ -*tag* die über Nitrilotriessigsäure an die Polysaccharid-Matrix der Säule gebundenen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (Ni-NTA-Matrix) an vier der sechs Koordinationsstellen. Die jeweils mit dem *tag* versehenen Proteine können so von den übrigen Proteinen des Rohextrakts, die diesen *tag* nicht besitzen, abgetrennt werden. Die Freisetzung der gebundenen Proteine gelingt dann durch kompetitive Verdrängung mit Hilfe von Imidazol.

Für die Aufreinigung eines Proteins aus 800 ml Zellkultur an einer FPLC-Anlage des Typs Äkta™ Prime (Amersham Pharmacia Biotech) wurden etwa 1.5 ml Ni-NTA-Matrix (Qiagen, Hilden) für die Säule verwendet. Die Säule wurde bei einer Flussrate von  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  gewaschen und mit der entsprechenden Anfangskonzentration an Puffer B equilibriert, worauf die Säule mit dem Zellrohextrakt aus dem Zellaufschluss beladen wurde. Dies geschah in der Regel bei 95% Puffer A, um die weniger spezifische Bindung unerwünschter Proteine an die Säule weitestgehend zu unterdrücken. Unter denselben Bedingungen wurde die Säule dann solange gewaschen, bis sich die Absorption des Eluats,

die in einer Durchflusszelle bei 280 nm verfolgt werden konnte, der Grundlinie näherte. Darauf wurde das gebundene Protein bei einer konstanten Flussrate von  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$  durch lineare Erhöhung des Anteils an Puffer B in der mobilen Phase von 5 auf 70% innerhalb von 30 min von der Säule eluiert und über einen Probenkollektor zu je 2 ml fraktioniert. Die Fraktionen konnten dann mit Hilfe des Bradford-Tests [Bradford, 1976] auf ihren Proteingehalt und per SDS-PAGE auf Reinheit untersucht werden, worauf geeignete Fraktionen vereinigt wurden. Zur Entfernung des in späteren Untersuchungen möglicherweise störenden Imidazols und anderer niedermolekularer Bestandteile sowie zur Einstellung für die Biochemie notwendiger definierter Pufferbedingungen wurde eine Diafiltration mit Assaypuffer und einem *Amicon Ultra-15*-Konzentrator (30 bzw. 50 kDa Molekularmassengrenze) der Firma Millipore (Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nachdem die Proteinlösungen dann geeignet ankonzentriert worden waren (zur Konzentrationsbestimmung s. 4.2.4), wurden sie entweder direkt in biochemischen Assays eingesetzt oder aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteine konnten über mehrere Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden.

<b>FPLC-Puffer A</b>	50 mM	HEPES (pH 8.0)
	300 mM	NaCl
<b>FPLC-Puffer B</b>	50 mM	HEPES (pH 8.0)
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
<b>Assaypuffer</b>	50 mM	HEPES (pH 7.0)
	100 mM	NaCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>

#### 4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration an Protein in aufgereinigten und umgepufferten Lösungen konnte photometrisch mit UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt werden, wenn der Extinktionskoeffizient des entsprechenden Proteins bekannt war [Gill & von Hippel, 1989]. Dieser wurde über die Computersoftware *Protean* nach Eingabe der Aminosäuresquenz des Proteins berechnet. Eine Probe der Proteinlösung wurde dann am *Pharmacia Biotech Ultrospec 3000*-Photometer gegen Dialysepuffer als Referenz vermessen und die Konzentration der Proteinlösung ermittelt. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten aller in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

**Tabelle 4-1** Für die Proteine berechnete theoretische Extinktionskoeffizienten bei 280 nm

Protein	Extinktionskoeffizient bei 280 nm
TycA-PCP-E	79610 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
GrsA-PCP-E	81600 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
TycB <sub>3</sub> -PCP-E	77500 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
FenD <sub>2</sub> -PCP-E	86110 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
TycB <sub>2-3</sub> -AT.CATE	226460 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
TycB <sub>2-3</sub> -AT.CAT/E <sub>tycA</sub>	229140 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
TycB <sub>2-3</sub> -AT.CATE/COM <sub>tycA</sub>	219490 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
TycB <sub>1</sub> -CAT/Te <sub>srf</sub>	116650 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

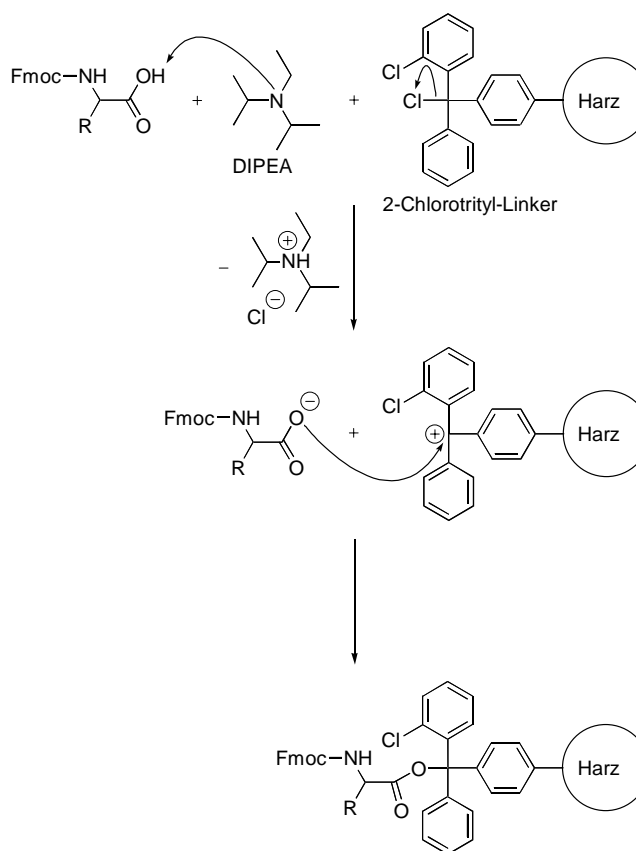
## 4.3 Chemische Methoden

### 4.3.1 Festphasen-Synthese von Peptiden (SPPS)

Die Synthese von C-terminal an einer unlöslichen Matrix verankerten Peptiden (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS) durch die schrittweise Zugabe von geschützten Aminosäure-Bausteinen ist besonders vorteilhaft, da sich Reagenzien und Nebenprodukte durch einfache Filtration entfernen lassen. Zudem ist die Methode zur Automatisierung geeignet, wodurch nicht nur eine enorme Arbeitserleichterung, sondern auch eine zusätzliche Zeitersparnis gewonnen werden können. Allerdings besteht ein Nachteil darin, dass sich Nebenprodukte aus unvollständig abgelaufenen Zwischenschritten, unerwünschten Seitenreaktionen oder verunreinigten Reagenzien an der Matrix akkumulieren können. Die Fmoc- (Fluorenylmethoxycarbonyl-) basierte sogenannte *batchwise* SPPS [Chan & White, 2000] wurde für diese Arbeit an einem vollautomatischen Peptid-Synthesizer (*APEX 396 Synthesizer* der Firma Advanced ChemTech) durchgeführt. Als Matrix diente dabei ein 2-Chlorotritylchlorid-Harz (quervernetztes Polystyrol mit einem 2-Chlorotrityl-Linker), das es ermöglicht, vollständig Seitenketten-geschützte Peptide abzulösen. Schutzgruppen an reaktiven funktionellen Gruppen bestimmter Aminosäure-Seitenketten sollten das Auftreten von Nebenreaktionen verhindern und beinhalteten: *tert*-Butyl (tBu), Trityl (Trt) und *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc).

#### 4.3.1.1 Initiation: Beladung der Matrix

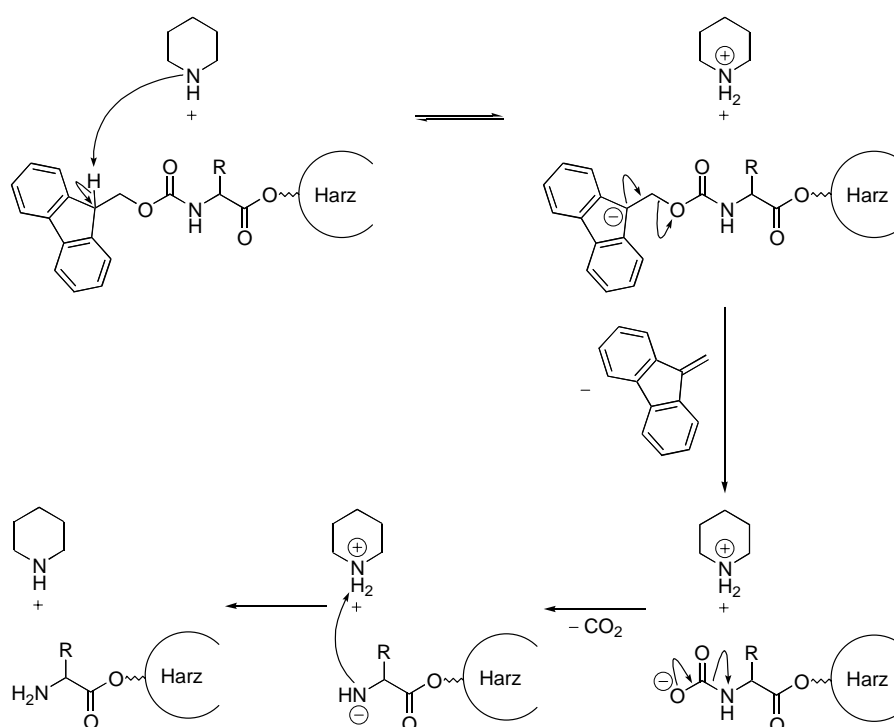
Die SPPS wird mit der Kupplung der ersten (C-terminalen) Aminosäure der gewünschten Sequenz an den 2-Chlorotrityl-Linker begonnen. Da der Umsatz dieser Reaktion für die Ausbeute an Produkt eine entscheidende Rolle spielt, ist eine möglichst quantitative Beladung erwünscht. Zudem soll eine Verminderung freier Stellen am Harz der Bildung verkürzter Peptide durch Reaktionen in späteren Zyklen vorbeugen. Zu diesem Zweck wurden zu einem Äquivalent des in trockenem DCM (Dichlormethan) gequollenen Harzes zwei Äquivalente *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure und acht Äquivalente DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) gegeben. Die sterisch gehinderte, schwache Base erzielt eine vollständige Deprotonierung der Carboxyl-Gruppe, die dann in einer nucleophilen ( $S_N1$ -) Reaktion das durch Bruch der labilen Trityl-C-Cl-Bindung entstandene Carbenium-Ion angreift, wodurch die C-terminale Aminosäure am Harz verankert wird (Abbildung 4-1). Nachdem die Reaktionsmischung zwei Stunden kräftig bewegt worden war, wurde das Lösungsmittel durch Filtration entfernt und die Matrix mehrere Male mit DCM gewaschen. Um die Bildung verkürzter Peptide durch unreaktierte Stellen am Harz zu unterbinden, wurde mit Methanol behandelt.



**Abbildung 4-1** Initiation der SPPS. In einer  $S_N1$ -Reaktion wird die C-terminale  $N_\alpha$ -Fmoc-geschützte Aminosäure über den 2-Chlorotrityl-Linker am Harz verankert.

#### 4.3.1.2 Elongation: Verknüpfung von Fmoc-Aminosäuren zu Peptiden

Damit die am Harz verankerte Peptidkette um eine Aminosäure elongiert werden kann, muss zunächst der N-Terminus von der Fmoc-Schutzgruppe befreit werden. Die Entschützung verläuft quantitativ über eine baseninduzierte Eliminierung ( $E1_{cb}$ ) durch Behandlung mit 15% Piperidin für 20 min. Das schwach basische Piperidin abstrahiert ein Proton, wobei als Zwischenstufe ein aromatisch stabilisiertes Fluorenyl- (dibenzoanelliertes Cyclopentadienyl-) Anion entsteht. Ein schneller Zerfall führt zur Bildung von Dibenzofulven und einer Carbamidsäure, die spontan decarboxyliert, so dass ein freier N-Terminus zurückbleibt (Abbildung 4-2).

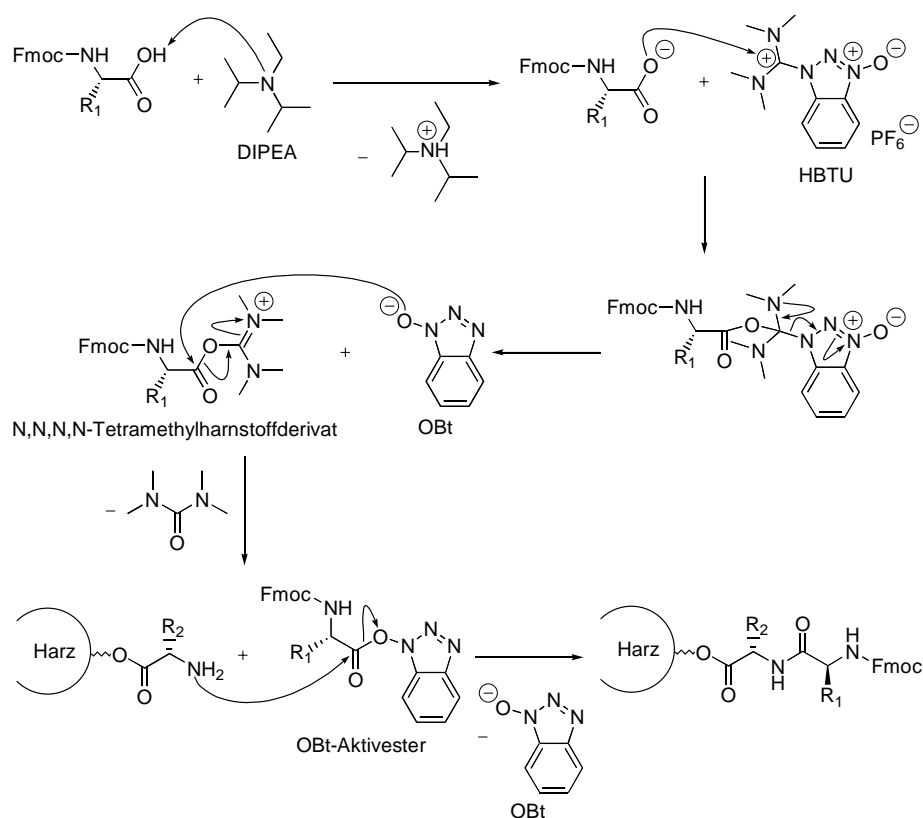


**Abbildung 4-2** Entschützung des N-Terminus. In einer durch die schwache Base Piperidin induzierten Eliminierung wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt.

Die Knüpfung einer Peptidbindung durch chemisches Vorgehen erfordert in der Regel die Aktivierung der Carboxyl-Gruppe eines hinzukommenden Fmoc-Aminosäure-Bausteins. Bei den Peptidsynthesen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *in situ* Aktivierung durch Verwendung des Kupplungsreagenzes HBTU in Verbindung mit dem Additiv HOBt in DMF erzielt. Ein zehnfacher Überschuss an DIPEA dient dabei der Deprotonierung der Carboxyl-Funktion, die als Nucleophil zunächst das elektrophile Carbenium-Ion von HBTU angreift. Das gebildete Intermediat zerfällt unter Entstehung eines sehr reaktiven N,N,N,N-Tetramethylharnstoffderivats, das im Folgeschritt durch das ebenfalls entstandene (als auch in



Form von HOBt zugesetzte) OBt unter Austritt von Tetramethylharnstoff am Carbonyl-C-Atom nucleophil angegriffen wird. Der aus dieser Reaktion hervorgehende Benzotriazolylester stellt die eigentlich aktive Spezies dar. In einer abschließenden  $S_N$ -Reaktion durch den freien N-Terminus des am Harz gebundenen Peptids mit der aktivierten Carboxyl-Gruppe wird unter Abgang von OBt die Peptidkette um eine Aminosäure elongiert (Abbildung 4-3). Um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten, wurde ein dreifacher Überschuss an Fmoc-Aminosäure zu Harzfunktionalität eingesetzt.



**Abbildung 4-3** Elongation. Nach chemischer Aktivierung wird eine Peptidbindung geknüpft.

#### 4.3.1.3 Termination: Freisetzen des synthetisierten Peptids von der Matrix

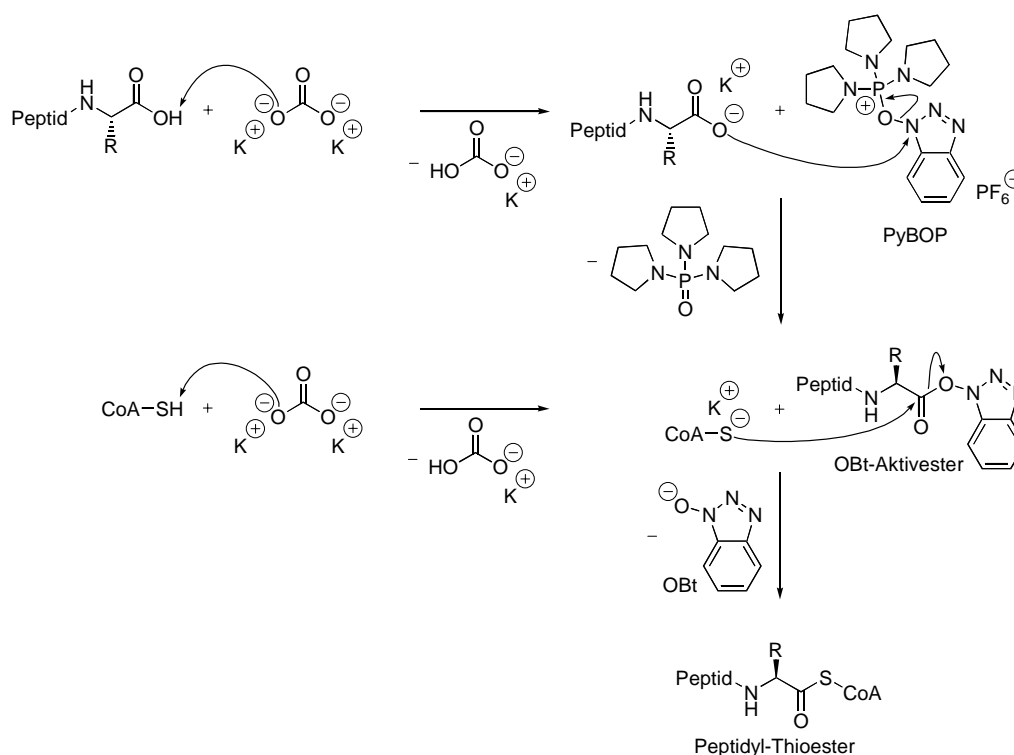
Das an den Seitenketten noch vollständig geschützte Peptid wurde vom Harz durch Behandlung der säurelabilen C-terminalen Peptid-2-Chlorotrityl-Linker-Bindung mit einer Mischung aus Essigsäure (AcOH), Trifluorethanol (TFE) und DCM (1 : 2 : 7) für 2 h abgespalten. Durch Filtration wurde das Peptid von der Matrix, die noch mehrmals nachgewaschen wurde, getrennt und in Hexan präzipitiert, worauf das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur Trockene des Produkts entfernt wurde.

### 4.3.2 Synthese von CoA-Derivaten

Die Synthese von Peptidyl-CoA-Thioestern erfordert eine selektive Aktivierung des C-Terminus am Synthesizer hergestellter Peptide, so dass diese daher an reaktiven Seitenketten vollständig geschützt blieben. Zusätzlich wurden bei der Peptidsynthese als N-terminale Monomere Boc-geschützte Aminosäuren eingesetzt.

#### 4.3.2.1 Synthese von Peptidyl-CoAs

Zur Kupplung mit Coenzym A (CoASH) wurden die Peptide C-terminal mit PyBOP (Benzo-triazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat) aktiviert (Abbildung 4-4). Dabei führt ein nucleophiler Angriff der durch Zugabe von  $K_2CO_3$  deprotonierten Carboxyl-Gruppe auf PyBOP zur Ausbildung eines Benzotriazolyl-Esters, der die durch  $K_2CO_3$  ebenfalls deprotonierte und somit nucleophile Thiolgruppe von CoA unter Austritt von OBt acyliert.



**Abbildung 4-4** Chemische Synthese Peptidyl-CoAs. Durch Aktivierung des C-Terminus mit PyBOP wird ein Peptid-Thioester gebildet.

Das generelle Vorgehen zur Synthese von Peptidyl-CoAs beruhte auf einer beschriebenen Methode zur Herstellung von Aminoacyl-CoAs [Belshaw *et al.*, 1999]. Ein Äquivalent geschütztes Peptid, 1.5 Äquivalente CoASH, 1.5 Äquivalente PyBOP und 4 Äquivalente  $K_2CO_3$  wurden in Tetrahydrofuran (THF)/H<sub>2</sub>O [1 : 1 (v/v)] gelöst. Die Mischung wurde für 2

h bei Raumtemperatur (RT) bewegt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Abspaltung der säurelabilen N-terminalen und Seitenketten-Schutzgruppen geschah darauf durch Behandlung mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und H<sub>2</sub>O (95 : 2.5 : 2.5) für 3 h bei RT. Das entschützte Peptidyl-CoA wurde durch Eintropfen der Reaktionsmischung in eiskalten Diethylether präzipitiert, dann durch Zentrifugation (4000 Upm bei 4 °C) für 5 min abgetrennt und konnte anschließend bei –20 °C gelagert werden. Zur Aufreinigung wurde das Rohprodukt in 5% Acetonitril/H<sub>2</sub>O (v/v) gelöst und an einem präparativen 1100 HPLC-System der Firma Agilent über eine *reversed-phase* Säule VP 250/21 Nucleodur 100–5 C18ec der Firma Macherey und Nagel getrennt.

**Tabelle 4-2** Charakterisierung der synthetisierten Peptidyl-CoAs durch ESI-FTICR-MS.

Verbindung <sup>a</sup>	Spezies	Gemessene Masse (berechnete Masse) [g mol <sup>-1</sup> ]	Δ [ppm]
1 fPFF-CoA	[M–H + 2 Na] <sup>+</sup>	1350.3444 (1350.3404)	–2.95
2 FF-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1084.2387 (1084.2413)	–2.37
3 Ff-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1084.2378 (1084.2413)	–3.20
4 FY-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1100.2325 (1100.2362)	–3.34
5 F(p-fluoro)F-CoA	[M–H + 2 Na] <sup>+</sup>	1124.2102 (1124.2138)	–3.19
6 FW-CoA	[M + H] <sup>+</sup>	1101.2649 (1101.2702)	–4.83
7 FL-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1050.2513 (1050.2569)	–3.63
8 FN-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1051.2122 (1051.2158)	–3.40
9 FS-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1024.2015 (1024.2049)	–3.30
10 FT-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1038.2169 (1038.2211)	–4.02
11 FD-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1052.1967 (1052.1998)	–2.94
12 FH-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1074.2279 (1074.2318)	–3.60
13 FK-CoA	[M + H] <sup>+</sup>	1043.2840 (1043.2859)	–1.79
14 SF-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1024.2013 (1024.2049)	–3.49
15 FP-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1034.2237 (1034.2256)	–1.85
16 FMeF-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1098.2536 (1098.2569)	–3.02
17 FFMef-CoA	[M + Na] <sup>+</sup>	1245.3194 (1245.3253)	–4.76

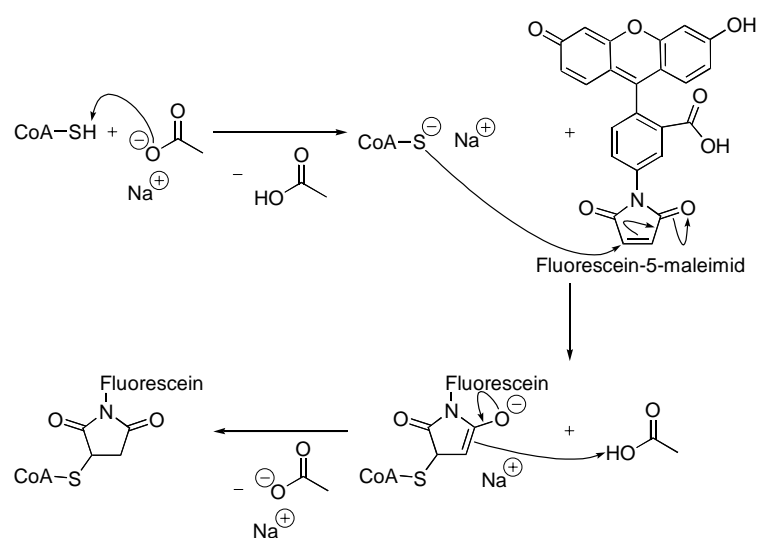
<sup>a</sup> Die Strukturen der CoA-Analoga sind in Abbildung 5-4 gezeigt.

Dabei wurde folgender Gradient bei einer Flussrate von 20 ml min<sup>-1</sup> verwendet [Laufmittel A: 0.1% TFA/Wasser (v/v), Laufmittel B: 0.1% TFA/Acetonitril (v/v)]: Injektion auf die Säule bei 5% Laufmittel B, 5 min isochratisch, dann linearer Gradient auf 40%

Laufmittel B innerhalb von 20 min gefolgt von einem weiteren auf 95% Laufmittel B innerhalb von 2 min. Nach 3 min Spülen bei 95% wurde wieder mit 5% Laufmittel B equilibriert. Automatisch gesammelte Fraktionen, die nach Detektion mit UV-Licht von 215 nm Wellenlänge die aufgereinigten Verbindungen enthielten, wurden lyophilisiert und die Identitäten der Produkte durch ESI-FTICR-MS (s. 4.5.1) verifiziert (Tabelle 4-2). Um zusätzlich die Thioester-Bindung der CoA-Derivate zu überprüfen, wurden diese mit 0.1 M KOH inkubiert und die Spaltprodukte per HPLC-MS analysiert.

#### 4.3.2.2 Synthese von Fluorescein-CoA

Die Herstellung von Fluorescein-CoA erfolgte über eine Michael-Addition durch Angriff der CoA-Thiolgruppe an die olefinische Funktion eines mit Fluorescein modifizierten Maleimids (Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5** Synthese von Fluorescein-CoA. Hierbei wurde die Reaktion von Thiolgruppen mit Maleimid-Derivaten in einer Michael-Addition ausgenutzt.

Es wurde in Anlehnung an ein beschriebenes Protokoll [La Clair *et al.*, 2004] vorgegangen. Eine Lösung von 10.7 mg (25  $\mu\text{mol}$ ) Fluorescein-5-Maleimid (Pierce) in 300  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde langsam zu einer Lösung von 25 mg CoASH (30  $\mu\text{mol}$ ) in 2 ml 50 mM MES/Acetate (pH 6.0) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht (üN) bei RT unter Lichtschutz bewegt und direkt zur Aufreinigung des Fluorescein-CoAs per präparativer HPLC aufgetrennt, wobei Säule und angelegter Gradient denen für die Aufreinigung von Peptidyl-CoAs beschriebenen (s. 4.3.2.1) entsprachen. Die Fraktion, die das Produkt enthielt wurde lyophilisiert und die Identität des CoA-Derivats durch ESI-TOF-MS (s. 4.5.1) ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , berechnete Masse: 1195.2  $\text{g mol}^{-1}$ , gemessene Masse: 1195.3  $\text{g mol}^{-1}$ ) verifiziert.

## 4.4 Biochemische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit rekombinanten Proteinen wurden in Assaypuffer (s. 4.2.3) durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen sind auf die fertigen Reaktionsansätze bezogen.

### 4.4.1 Modifikation der Enzyme mit CoASH oder CoA-Derivaten und Sfp

Alle Synthetasen dieser Arbeit wurden in *E. coli* M15 als Apoproteine überproduziert, so dass sie für biochemische Untersuchungen zunächst *in vitro* in die aktive Holo-Form überführt werden mussten. Hierfür wurde die rekombinante Ppant-Transferase Sfp aus *B. subtilis* [Reuter *et al.*, 1999], die natürlicherweise mit dem Surfactin-Operon assoziiert ist, eingesetzt. Für die Verwendung von CoA-Derivaten in Proteinassays wurde die Promiskuität von Sfp – es akzeptiert auch Aminoacyl- [Belshaw *et al.*, 1999], Peptidyl- [Sieber *et al.*, 2003] sowie anders an der SH-Gruppe derivatisierte CoA-Analoga [La Clair *et al.*, 2004] als Substrate – ausgenutzt.

Zur posttranslationalen Modifikation mit dem Ppant-Cofaktor – dem sogenannten *priming* – wurden die dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Derivate oder das in Produktbildungsassays als Akzeptorprotein dienende TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> (40–50 µM) mit 200 µM CoASH und 15 µM Sfp für 5 min bei 37 °C inkubiert.

Die Apo-PCP-E-Didomänen (50–90 µM) wurden zunächst mit 100 µM Peptidyl-CoA bei 37 °C inkubiert, worauf die Beladung durch Zugabe von 15 µM Sfp bei gleich bleibender Temperatur initiiert wurde.

Die Fluoreszenz-Markierung des in den PCP-Domänen der dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Derivate vorhandenen aktiven Serins erfolgte durch Inkubation der Enzyme (40 µM) mit 200 µM Fluorescein-CoA und 15 µM Sfp für 5 min bei 37 °C.

<b>Modifikationsansatz</b>	40–90 µM	Enzym
	100–200 µM	CoASH oder CoA-Analogon
	15 µM	Sfp

### 4.4.2 Experimente mit den PCP-E-Didomänen

#### 4.4.2.1 Epimerisierungsassay

Um die Epimerisierung des ersten, direkt über einen Thioester gebundenen Aminosäurerests an einem Peptidyl-S-Ppant-Substrat verfolgen zu können, wurde die Modifikation der PCP-E-

Enzyme wie oben beschrieben (s. 4.1.1) in einem Gesamtvolumen von 600  $\mu\text{l}$  initiiert. Zu definierten Zeitpunkten nach der Zugabe von Sfp wurden Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  entnommen und sofort in 1 ml 10% TCA (w/v) gegeben, was die Reaktion durch Präzipitation der Proteine stoppte. Zur quantitativen Fällung wurde vortexiert, für 15 min auf Eis inkubiert und der Niederschlag durch Zentrifugation (13000 Upm bei 4 °C) für 45 min abgetrennt. Zur Entfernung der überschüssigen CoA-Derivate sowie restlicher TCA wurden die Pellets einmal mit 750  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus Diethylether und Ethanol (3 : 1) und ein weiteres Mal mit 750  $\mu\text{l}$  Diethylether gewaschen, wobei jedes Mal für 5 min zentrifugiert (13000 Upm bei 4 °C) und dann der Überstand entfernt wurde. Nachdem die Pellets für 5 min bei 37 °C getrocknet worden waren, wurden die Reaktionsprodukte durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  einer 0.1 M KOH-Lösung und Inkubation im Heizschüttler für 15 min (1400 Upm bei 70°C) über eine alkalische Thioesterspaltung freigesetzt. Zur Fällung der Proteinbestandteile und Extraktion der freigesetzten Peptide wurde 1 ml Methanol zugegeben, vortexiert, mindestens 20 min auf Eis (besser jedoch über Nacht bei -20 °C) inkubiert und anschließend für 30 min zentrifugiert (13000 Upm bei 4 °C). Die Überstände wurden in saubere Reaktionsgefäße überführt und das Lösungsmittel im Vakuum an einer *Speed-Vac* entfernt. Es folgte die Aufnahme der Rückstände in 20  $\mu\text{l}$  Wasser und die Analyse durch HPLC-MS (s. 4.5.2.1).

<b>Epimerisierungsansatz</b>	40–90 $\mu\text{M}$	Enzym
	100 $\mu\text{M}$	Peptidyl-CoA
	15 $\mu\text{M}$	Sfp

#### 4.4.2.2 Assay für die Elongation von Peptidyl-Substraten durch TycB<sub>1</sub>-C

TycA-PCP-E (50  $\mu\text{M}$ ) wurde mit ausgewählten CoA-Derivaten und Sfp wie oben beschrieben (4.4.1) für 5 min bei 37 °C inkubiert, um mit den entsprechenden Peptidyl-S-Ppant-Anteilen modifiziert zu werden und die Substrate epimerisieren zu können. In einem getrennten Ansatz wurde bereits in die Holo-Form überführtes TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> (50  $\mu\text{M}$ ) mit 200  $\mu\text{M}$  L-Pro und 1 mM ATP für 5 min bei 37 °C präinkubiert. Die Elongationsreaktionen wurden durch Mischen gleicher Volumina beider Ansätze initiiert, liefen für 1 h (*single turnover*-Reaktion) bei 37 °C und wurden dann durch Zugabe von 1 ml Methanol beendet. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (13000 Upm bei 4 °C) für 30 min entfernt und die Überstände in saubere Reaktionsgefäße überführt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum an einer *Speed-Vac* entfernt, die Rückstände in 20  $\mu\text{l}$  10% (v/v) Methanol gelöst und per HPLC-MS (s. 4.5.2.2) analysiert.

<b>Donoransatz</b>	50 $\mu$ M	TycA-PCP-E
	100 $\mu$ M	Peptidyl-CoA
	15 $\mu$ M	Sfp
<b>Akzeptoransatz</b>	50 $\mu$ M	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te <sub>srf</sub>
	200 $\mu$ M	CoASH
	15 $\mu$ M	Sfp
	200 $\mu$ M	L-Pro
	1 mM	ATP

#### 4.4.3 Experimente mit den dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Derivaten

##### 4.4.3.1 Identifizierung von tryptischen TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmenten mit aktivem Serin

Das entsprechende TycB<sub>2-3</sub>-Protein wurde zur posttranslationalen Modifikation wie zuvor beschrieben (s. 4.4.1) inkubiert. War mit Fluorescein-CoA modifiziert worden, wurde überschüssiges Markierungsreagenz entfernt, indem die Reaktionsmischungen über *AutoSeq*<sup>TM</sup> G-50 Säulchen der Firma Amersham Pharmacia Biosciences (Freiburg) durch leichte Zentrifugation (4600 Upm bei RT) für 1 min filtriert wurden. Zur natürlichen Substrataktivierung wurden Holo-Proteine erzeugt (s. 4.4.1) und den Reaktionsmischungen 1 mM Phe beigelegt. Die enzymatischen Reaktionen wurden mit der Zugabe von 1 mM ATP gestartet, und es wurde bei 37 °C inkubiert. Die tryptischen Verdaue wurden dann mit *sequencing grade trypsin* der Firma Promega (Lösung von 0.8  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> Trypsin in Assaypuffer) in einem Endverhältnis Protease zu Substrat von 1 : 5 (w/w) und Inkubation von 5 min bei 30 °C vorgenommen. Zum Beenden der Proteolyse wurde mit Ameisensäure zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) versetzt und die Reaktionsmischungen im Anschluss über das unten genannte HPLC-Verfahren (4.5.2.3 und 4.5.2.4) analysiert.

<b>Markierungsansatz</b>	40 $\mu$ M	TycB <sub>2-3</sub> -Derivat
	200 $\mu$ M	Fluorescein-CoA
	15 $\mu$ M	Sfp
<b>Aktivierungsansatz</b>	40 $\mu$ M	TycB <sub>2-3</sub> -Derivat
	200 $\mu$ M	CoASH
	15 $\mu$ M	Sfp
	1 mM	L-Phe
	1 mM	ATP
<b>Proteolyseansatz</b>	1 : 5 (w <sub>Protease</sub> /w <sub>Substrat</sub> )	Zugabe von Trypsin

Zur Erfassung des möglichen proteolytischen Spaltungsmusters und der theoretischen Massen aller tryptischen Fragmente wurde ein Verdau von TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE *in silico* mit Hilfe des Programms ExPASy-PeptideMass ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) vorgenommen.

#### 4.4.3.2 Assay für die Verfolgung der Phe-Phe-S-Ppant-Bildung

Die Holo-TycB<sub>2-3</sub>-Enzyme wurden wie beschrieben generiert (s. 4.4.1) und zur Beladung mit Phe inkubiert (s. 4.4.3.1). Zu definierten Zeitpunkten nach der Zugabe von ATP wurden Aliquots von 25 µl entnommen, direkt wie zuvor dargelegt tryptisch verdaut (s. 4.4.3.1) und nach dem Versetzen mit Ameisensäure über die unten aufgeführte HPLC-Prozedur (s. 4.5.2.3 und 4.5.2.5) präfraktioniert sowie analysiert.

#### 4.4.3.3 Produktbildungsassay mit TycB<sub>1</sub>

In Reaktionsmischungen, die ein entsprechendes TycB<sub>2-3</sub>-Derivat und TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> (je 40 µM) sowie 200 µM L-Phe und 200 µM L-Pro enthielten, wurde zur Modifikation mit dem Ppant-Arm (s. 4.4.1) mit CoASH und Sfp präinkubiert. Die Zugabe von 1 mM ATP initiierte dann die katalytischen Reaktionen der Synthetasen. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots von 200 µl entnommen und zum Beenden der Reaktionen sofort in 1 ml Methanol gegeben. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie beschrieben für die Elongationsassays mit TycA-PCP-E (s. 4.4.2.2) und die Analyse durch HPLC-MS wie weiter unten erläutert (s. 4.5.2.2).

<b>Donoransatz</b>	40 µM	TycB <sub>2-3</sub> -Derivat
	200 µM	CoASH
	15 µM	Sfp
	200 µM	L-Phe
	1 mM	ATP
<b>Akzeptoransatz</b>	40 µM	TycB <sub>1</sub> -CAT/Te <sub>srf</sub>
	200 µM	CoASH
	15 µM	Sfp
	200 µM	L-Pro
	1 mM	ATP



## 4.5 Analytische Methoden

### 4.5.1 Massenspektrometrie

Schnelle Analytik auf Produkte in Fraktionen der HPLC-Aufreinigung synthetisierter CoA-Analoga geschah durch MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*-Massenspektrometrie). Dazu wurden je 1 µl Probe einer Fraktion mit 1 µl DHB-Matrix-Lösung (Agilent Technologies) vermischt, auf eines von 384 Probenfeldern des Metall-*Targets* gegeben und an der Luft getrocknet. Die kokristallisierten Proben wurden an einem *Bruker Flex III*-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics (Leipzig) gemessen.

Die Charakterisierung der CoAs erfolgte durch ESI-FTICR- (*electrospray ionization-fourier transform ion cyclotron resonance*-) MS an einem *Finnigan-LTQ-FT*-Massenspektrometer der Firma Thermo Electron Corp. (Bremen). Da die Massengenauigkeit dieser hoch sensitiven Methode bei  $< \pm 5$  ppm liegt, war eine eindeutige Identifizierung der Produkte möglich. Alternativ wurde eine ESI-TOF-MS-Analyse an einem *Qstar* Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt.

### 4.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Die Separierung und Identifizierung der Produkte in Proben aus den Epimerisierungs- (s. 4.4.2.1) und Produktbildungsassays (s. 4.4.2.2 und 4.4.3.3) sowie aus den tryptischen Verdauen nach Fluoreszenzmarkierung oder natürlicher Beladung der aktiven TycB<sub>2-3</sub>-PCP-Serine und der direkten Untersuchung der Phe-Phe-S-Ppant-Bildung erfolgte mit Hilfe von HPLC- (*high performance liquid chromatography*) Systemen *Series 1100* der Firma Agilent (Waldbronn). Da die Geräte über Probenwechsler verfügten, konnten sämtliche Messungen nach Programmierung der entsprechenden Methoden über die Computersoftware *HP-Chemstation* automatisiert vorgenommen werden. Zur chromatographischen Auftrennung wurden die Reaktionsgemische auf geeignete *reversed*-phase Säulen injiziert. Die Aufnahme eines Elutionsprofils und die Produktidentifizierung erfolgte durch UV-Detektion mit einem Agilent *1100 VWD* (bei 215 nm) bzw. durch Kopplung mit Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS).

#### 4.5.2.1 HPLC-MS-Analytik der Epimerisierungsprodukte

Abhängig von den im Epimerisierungsassay (s. 4.4.2.1) freigesetzten Peptiden wurden die folgenden HPLC-Methoden zur Analyse von je 20 µl injizierter Probe eingesetzt. Laufmittel

A war 0.05% Ameisensäure/Wasser (v/v), und Laufmittel B war 0.04% Ameisensäure/Methanol (v/v). Für die Gradienten 1 und 2 wurde eine Säule *CC 250/2 Nucleodur C18 Pyramid* (5  $\mu\text{m}$ ) der Firma Macherey und Nagel bei einer Flussrate von 0.3 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 25 °C zur Trennung der Reaktionsprodukte verwendet.

Gradient 1 wurde für die Analyse und Trennung von Peptiden, die nach Verwendung der CoAs **1–7** und **15–17** (vgl. Abbildung 5-4) freigesetzt worden waren, angewendet: Injektion der Probe bei 10% Laufmittel B, linearer Gradient auf 60% Laufmittel B innerhalb von 25 min gefolgt von einem weiteren auf 100% Laufmittel B innerhalb von 5 min. Nach 5 min Spülen bei 100% wurde wieder mit 10% Laufmittel B equilibriert.

Gradient 2 wurde für die Trennung von Peptiden, die nach Verwendung der CoAs **8–14** (vgl. Abbildung 5-4) freigesetzt worden waren, angewendet: Injektion der Probe bei 5% Laufmittel B, 5 min isochratisch, dann linearer Gradient auf 60% Laufmittel B innerhalb von 20 min gefolgt von einem weiteren auf 100% Laufmittel B innerhalb von 5 min. Nach 5 min Spülen bei 100% wurde wieder mit 5% Laufmittel B equilibriert.

Die *N*-methylierten Tripeptid-Diastereomere nach Verwendung des CoAs **17** wurden über eine Säule *LiChro-CART 250–4 ChiraDex Gamma* (5  $\mu\text{m}$ ) der Firma Merck (Darmstadt) mit einer isochratischen Methode (5% Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0.8 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 15 °C getrennt.

In allen Fällen wurden die diastereomeren Produkte durch Vergleich mit hydrolysierten Peptidyl-CoAs als Standard und über *online* ESI-MS oder ESI-SIM- (*single ion mode*) MS mit einem Agilent *1100 MSD* im *positive ion mode* identifiziert und durch Bestimmung des Integrals unter der Fläche des extrahierten  $[M + H]^+$ -Signals relativ zueinander quantifiziert.

#### 4.5.2.2 HPLC-MS-Analytik nach Produktbildungsassays

Von Proben aus den Elongationsassays mit TycA-PCP-E und TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> (s. 4.4.2.2) wurden je 20  $\mu\text{l}$  zur Analyse auf eine Säule *CC 250/2 Nucleodur C18 Pyramid* (5  $\mu\text{m}$ ) injiziert und mit dem oben erwähnten Gradienten 1 (s. 4.5.2.1) aufgetrennt. Die Massenanalytik erfolgte dabei ebenfalls wie oben beschrieben. Die Proben der Produktbildungsassays mit den dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Proteinen und TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> (100  $\mu\text{l}$  Injektionsvolumen) wurden analog getrennt, jedoch erfolgte die *online* ESI-TOF- (*time of flight*) MS-Analyse mit einem *Qstar* Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) im *positive ion mode*.

#### 4.5.2.3 HPLC-Analyse und Fraktionierung nach tryptischem Verdau

Zur Trennung der tryptischen Fragmente, die durch Verdau der TycB<sub>2-3</sub>-Synthetasen nach Beladung mit Fluorescein-CoA oder nach natürlicher Substrataktivierung in einem komplexen Gemisch vorlagen, wurden 50 µl einer Probe auf einer Säule *150 × 2 mm Jupiter C4 (5 µm)* der Firma Phenomenex bei einer Flussrate von 0.5 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 40 °C aufgetrennt. Dabei wurde der folgende Gradient verwendet [Laufmittel A: 0.1% TFA/Wasser (v/v), Laufmittel B: 0.1% TFA/Actonitril (v/v)]: Injektion der Probe bei 10% Laufmittel B, linearer Gradient auf 65% Laufmittel B innerhalb von 30 min gefolgt von einem weiteren auf 95% Laufmittel B innerhalb von 5 min. Nach 2 min Spülen bei 95% wurde wieder mit 10% Laufmittel B equilibriert. Mit Fluorescein markierte Peptide wurden durch Detektion mit einem *Series 1100 FLD* (Agilent) sichtbar gemacht, wobei mit Licht der Wellenlänge 490 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm gemessen wurde. Mit einem analytischen Fraktionskollektor *Series 1100* (Agilent) wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt, lyophilisiert und bis zur weiteren Analytik bei -20 °C gelagert.

#### 4.5.2.4 HPLC-MS-Analyse der tryptischen Fragmente

Die präfraktionierten, getrockneten (s. o.) Proben der tryptischen Verdau wurden in 100 µl 10% (v/v) Methanol mit 1% (v/v) Ameisensäure gelöst und das gesamte Volumen in einem weiteren HPLC-Durchgang auf eine Säule *125/2 Nucleodur C8 (3 µm)* der Firma Macherey und Nagel injiziert. Zur chromatographischen Trennung wurde der folgende Gradient bei einer Flussrate von 0.3 ml min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 25 °C verwendet [Laufmittel A: 0.05% Ameisensäure/Wasser (v/v), Laufmittel B: 0.05% Ameisensäure/Methanol (v/v)]: Injektion der Probe bei 40% Laufmittel B, linearer Gradient auf 95% Laufmittel B innerhalb von 15 min gefolgt von 5 min Spülen bei 95%, worauf wieder mit 40% Laufmittel B equilibriert wurde. *Online ESI-FTICR- (fourier transform ion cyclotron resonance) MS* wurde mit einem *Finnigan-LTQ-FT*-Massenspektrometer der Firma Thermo Electron Corp. (Bremen) durchgeführt. Durch die exakte Massenwiedergabe über das FTICR war eine eindeutige Identifizierung der peptidischen Fragmente möglich.

#### 4.5.2.5 HPLC-MS<sup>2</sup>-Methode zur Verfolgung der Phe-Phe-S-Ppant-Bildung

Die nach natürlicher Substrataktivierung tryptisch verdauten Proben der TycB<sub>2-3</sub>-Derivate wurden wie beschrieben präfraktioniert (s. 4.5.2.3). Fraktionen, die die entsprechenden Holo-, Phe-S-Ppant- und Phe-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>-Lys<sup>1595</sup>) enthielten, wurden nach dem

Lyophilisieren und Lösen in 10% Methanol mit 1% Ameisensäure vereinigt, bevor sie wie beschrieben (s. 4.5.2.4) in einem weiteren HPLC-Durchgang aufgetrennt wurden. Um die Sensitivität der ESI-FTICR-MS-Methode signifikant zu erhöhen, wurde die Quantifizierung der entsprechenden TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente, die das modifizierte aktive Serin enthielten, im *single reaction monitoring*- (SRM-) Modus des *LTQ*-Massenspektrometers vorgenommen. Die für die MS<sup>2</sup>-Analyse ausgewählten Massen ( $m/z$ ) waren 1098.0 ( $[M + 2H]^{2+}$  für das Holo-), 1171.1 ( $[M + 2H]^{2+}$  für das Phe-*S*-Ppant-) und 1245.0 ( $[M + 2H]^{2+}$  für das Phe-Phe-*S*-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragment). Der Analysator wurde auf den Massenbereich 1914.5–1919.5 fixiert, und die Fragmentationsenergie betrug 35 mit Breitband-Aktivierung. Die Quantifizierung wurde dann durch einfaches Integrieren der Flächen unter den zu den einzelnen Spezies gehörenden Signalen vorgenommen.

## 5 Ergebnisse

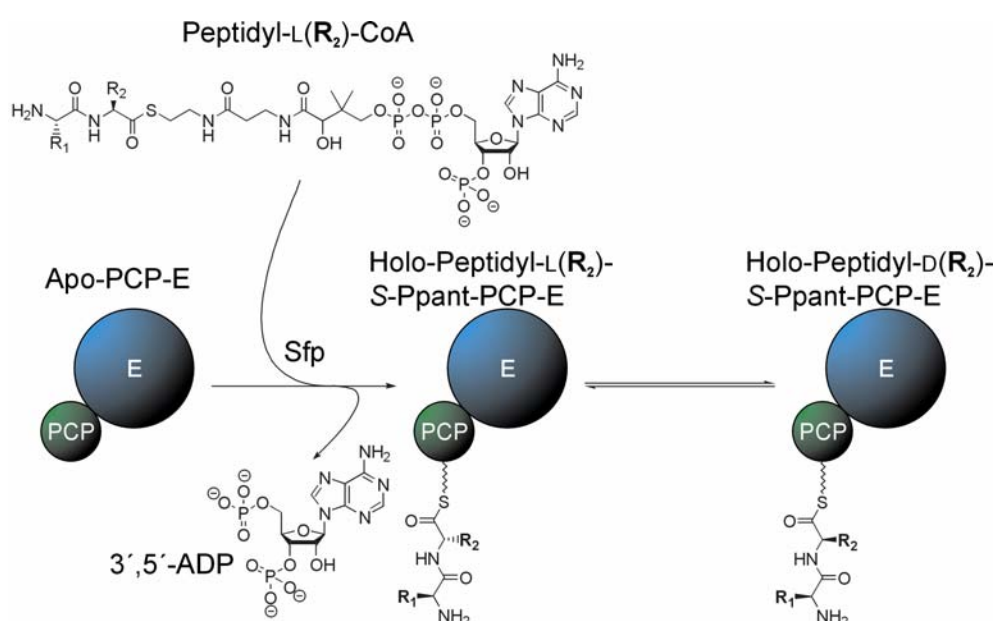
Der Einbau von D-Aminosäuren unter Beteiligung von E-Domänen wird in vielen NRPS-Systemen beobachtet. Ziel dieser Arbeit war es, das Wissen um die native Substratspezifität und die Funktionalität von E-Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese zu vertiefen.

### 5.1 Chemoenzymatische Charakterisierung der Substratspezifität von E-Domänen

In Systemen der nichtribosomalen Peptidsynthese sind E-Domänen stets in Module eingebunden, so dass ihre Substrate zum einen – in Bezug auf die C-terminal über einen Thioester gebundene Aminosäure – durch die Spezifität entsprechender zu den Modulen gehörender A-Domänen und zum anderen – in Bezug auf die Länge – durch ihre Positionierung innerhalb des Multienzyms vorgegeben sind. Verschiedene Strategien wurden bereits angewendet, um E-Domänen in Bezug auf ihre Substratspezifität biochemisch zu charakterisieren. Bei einer der Vorgehensweisen wurden Fusionsproteine des Typs A/PCP-E konstruiert. Durch Austausch der A-Domäne im Phe aktivierenden Initiationsmodul TycA konnten der E-Domäne verschiedene Aminoacyl-Substrate angeboten werden [Linne *et al.*, 2001]. Obwohl es auf diese Weise möglich war herauszufinden, dass TycA-E auch Trp, Ile und Val mit nur leicht abgeschwächter Effizienz invertieren kann, liegt die größte Einschränkung dieser immens zeitaufwendigen genetischen Methode im geringen Durchsatz. Eine Alternative mit schneller Variationsmöglichkeit ist die beschriebene Verwendung von aminoacylierten Pantetheinen, die als lösliche Substrate von GrsA-ATE akzeptiert werden sollen [Luo *et al.*, 2001]. Da mit Hilfe dieser Mimiken ermittelte  $K_m$ -Werte jedoch im mM-Bereich lagen, muss davon ausgegangen werden, dass sich so keine Informationen über die Spezifität von E-Domänen gewinnen lassen, die einen Schluss auf ihr Verhalten gegenüber den natürlichen Substraten (Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Pant-PCPs) erlauben.

Bei dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz sollte die Untersuchung der unverfälschten Spezifität von E-Domänen mit wenigen Reaktionsschritten, hohem Durchsatz und großer Möglichkeit zur Variierung der Substrate kombiniert werden. Also wurde entschieden, die Promiskuität der Ppant-Transferase Sfp zur Übertragung der Peptidyl-S-Pant-Einheiten von entsprechend chemisch synthetisierten CoAs auf PCP-Domänen [Belshaw *et al.*, 1999] auszunutzen. Hierfür waren PCP-E-Domänen als kleinste geeignete Enzymsysteme [Stachelhaus & Walsh, 2000] denkbar, zudem der Kontakt einer E-Domäne zu ihrem nativen

PCP<sup>E</sup> von entscheidender Bedeutung für ihre Aktivität zu sein scheint [Linne *et al.*, 2001]. Nach erfolgter Fehlmodifizierung (*mispriming*) des Apo-PCPs müsste die katalytische Inversion der über einen Thioester gebundenen Aminosäure durch die E-Domäne stattfinden und in einem bestimmten L zu D Gleichgewicht enden. Als Indikator für die Substrattoleranz der jeweiligen E-Domäne sollte neben dem Endgleichgewicht die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Epimerisierung dienen, wobei eine HPLC-MS-Analytik nach chemischer Freisetzung der Reaktionsprodukte vorgesehen war. In Abbildung 5-1 ist dieses neue Minimalsystem zur chemoenzymatischen Hinterfragung der nativen Substratspezifität von E-Domänen skizziert.

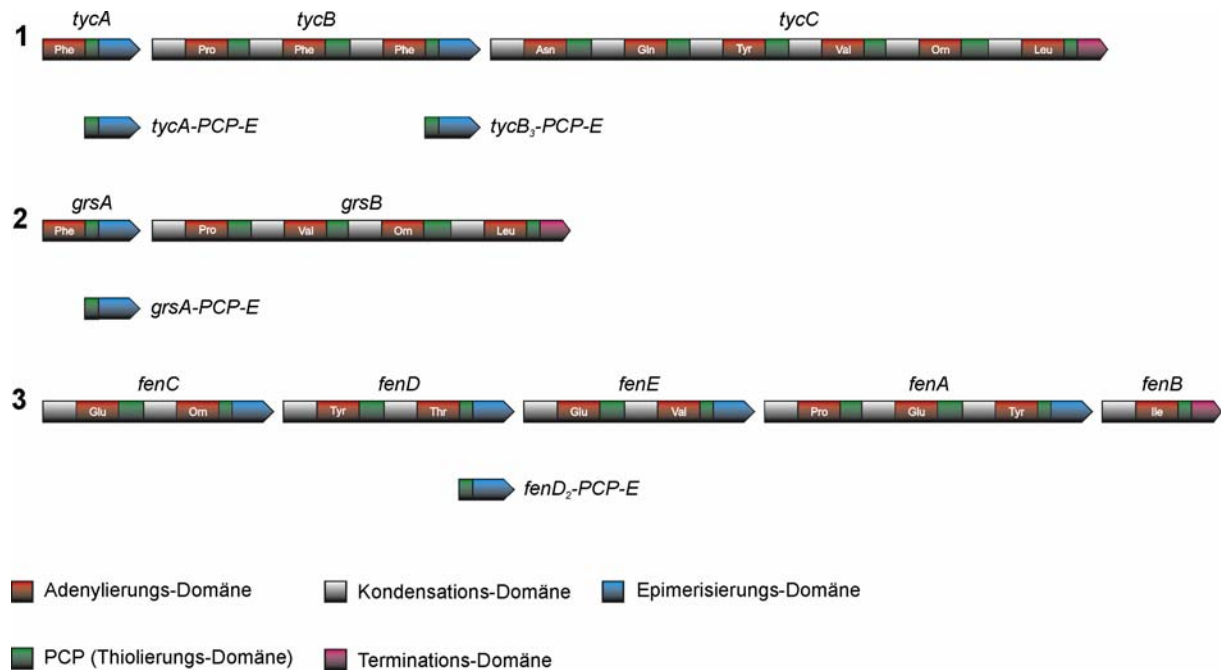


**Abbildung 5-1** Schematische Darstellung des chemoenzymatischen Assaysystems zur Untersuchung der Substratspezifität von E-Domänen. Das PCP des Didomänen-Proteins wird unter Katalyse durch die Ppant-Transferase Sfp mit der Peptidyl-S-Ppant-Einheit des CoA-Derivats beladen. Dieser Vorgang initiiert die katalytische Inversion des enzymgebundenen Substrats am C<sub>α</sub>-Atom der C-terminalen Aminosäure (R<sub>2</sub>) durch die E-Domäne, wobei ein Gleichgewicht zwischen L- und D-Peptidyl-S-Ppant-Intermediat eingestellt wird.

### 5.1.1 Erzeugung und Aufreinigung der rekombinanten PCP-E-Didomänen

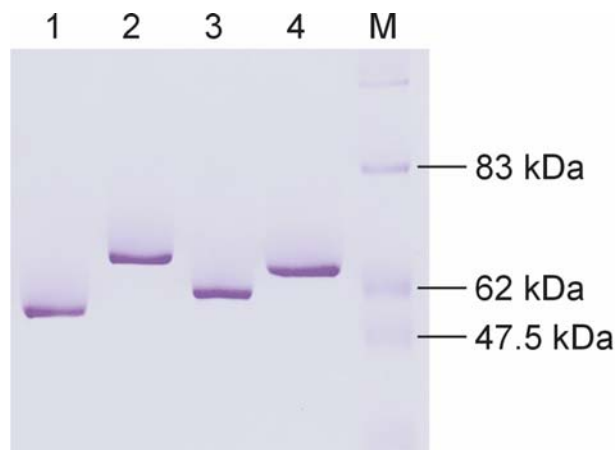
Vier für PCP-E-Didomänen kodierende Fragmente unterschiedlicher genetischer Herkunft (Abbildung 5-2) wurden für die Konstruktion entsprechender rekombinanter Plasmide kloniert (s. Kapitel 4.1.1.1). Alle Konstrukte waren so gewählt, dass die rekombinanten Proteine E-Domänen beherbergen, die natürlicherweise am C-terminalen Ende einer Synthetase vorzufinden sind. Zwei der Enzyme [TycA-PCP-E (65.6 kDa) und GrsA-PCP-E

(67.6 kDa)] enthielten E-Domänen aus Initiationsmodulen, die beide die Aktivierung und Inkorporation von Phe katalysieren [Mootz & Marahiel, 1997a; Krätzschmar, *et al.*, 1989]. TycA- und GrsA-E epimerisieren in ihrem natürlichen System ausschließlich Aminoacyl-S-Ppant-Substrate und werden daher auch als Aminoacyl-E-Domänen bezeichnet.



**Abbildung 5-2** Schematische Darstellung der Biosyntheseoperons von (1) Tyrocidin aus *B. brevis* ATCC 8185, (2) Gramicidin S aus *B. brevis* ATCC 9999 und (3) Fengycin aus *B. subtilis* F29-3. Die für die Konstruktion der rekombinanten PCP-E-Domänen-Proteine klonierten Genfragmente sind in Beachtung ihrer relativen Lage unterhalb eines jeden Systems gezeigt.

Im Gegensatz dazu schließen die anderen zwei Enzyme [TycB<sub>3</sub>-PCP-E (63.9 kDa) und FenD<sub>2</sub>-PCP-E (66.8 kDa)] E-Domänen aus Elongationsmodulen ein. TycB<sub>3</sub> ist ebenfalls für die Aktivierung und den Einbau von Phe zuständig [Mootz & Marahiel, 1997a], während FenD<sub>2</sub> ein Thr-spezifisches Modul darstellt [Lin *et al.*, 1999]. Die E-Domänen dieser beiden Konstrukte empfangen in ihrem natürlichen enzymatischen Umfeld ein Tetrapeptidyl-S-Ppant-Substrat, dessen C-terminale Aminosäure katalytisch invertiert wird. Sie werden daher als Peptidyl-E-Domänen bezeichnet. Alle Gene wurden separat in dem heterologen Wirt *E. coli* M15/pREP4 unter Standardbedingungen bei 30 °C (s. 4.2.1) exprimiert. Durch die Überproduktion der rekombinanten Proteine mit einer C-terminalen His<sub>6</sub>-tag Fusion konnten diese durch einfache Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie (IMAC, s. 4.2.3) gereinigt werden (überprüft durch SDS-PAGE, s. Abbildung 5-3) und waren zur Lagerung bei -80 °C über mehrere Wochen ohne merklichen Aktivitätsverlust geeignet.



**Abbildung 5-3** Beispiel für die SDS-PAGE-Analyse überproduzierter und per  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC aufgereinigter rekombinanter Synthetasen. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes 10%iges Gel. Aufgetragen wurden die generierten Didomänen. Spur 1: TycB<sub>3</sub>-, Spur 2: FenD<sub>2</sub>-, Spur 3: TycA- und Spur 4: GrsA-PCP-E; M: Protein Molmarker.

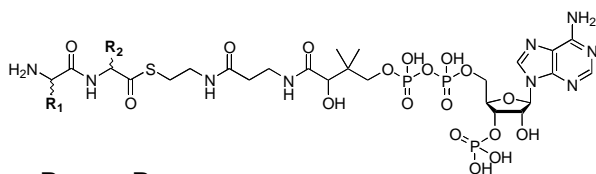
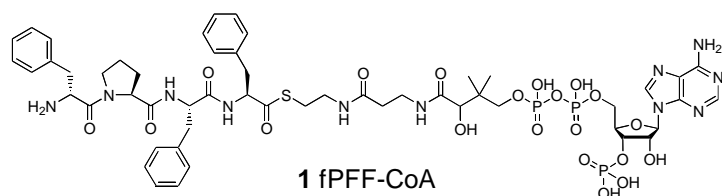
### 5.1.2 Entwicklung des Epimerisierungsassays

Nachdem das Konzept zur Untersuchung der E-Domänen-Substratspezifität festgelegt und entsprechende Enzymsysteme überproduziert worden waren, galt es, geeignete CoA-Vorläufer und die günstigsten Bedingungen für den Assay zu bestimmen. Dabei wurde die Präparation und Verwendung von Peptidyl- anstatt Aminoacyl-CoAs bevorzugt, da E-Domänen zuvor noch nicht mit variierenden elongierten S-Ppant-Substraten getestet worden waren. Somit sollte nicht nur eine Aussage über die Fähigkeit von Aminoacyl-E-Domänen zur Epimerisierung von Peptidyl-Substraten ermöglicht werden, sondern auch ein denkbarer Einfluss anderer Aminosäurereste – neben dem, der eigentlich invertiert wird – auf die Erkennung durch das Enzym aufgedeckt werden können. Zugleich sollte auch die vorgesehene HPLC-Analytik durch die leichtere Trennbarkeit freigesetzter diastereomerer Reaktionsprodukte (im Vergleich zur Enantiomerentrennung) vereinfacht werden.

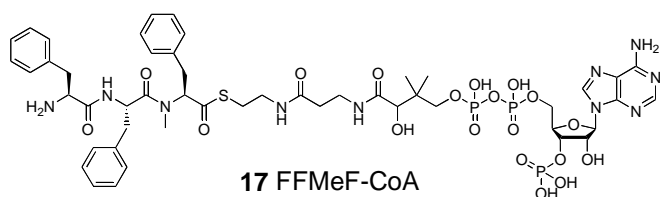
In ersten Experimenten zeigte sich, dass der Peptidyl-S-Ppant-Anteil entsprechend synthetisch hergestellter CoA-Derivate (die chemischen Strukturen der verwendeten Peptidyl-CoAs sind in Abbildung 5-4 gezeigt) auf die rekombinanten PCP-E-Konstrukte übertragen werden kann, wobei der Einsatz der 4'-Ppant-Transferase Sfp [Reuter *et al.*, 1999; Mofid *et al.*, 2004] in einer Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  eine schnelle Modifikation bewirkte (vgl. 4.4.2.1). Die Reaktionen konnten zu definierten Zeitpunkten nach der Zugabe von Sfp durch das Quenchen entnommener Aliquots in 10%iger TCA beendet werden, wobei die Proteine inklusive der säurestabil enzymgebundenen Peptidyl-S-Ppant-Intermediate präzipitierten. Nach Pelletieren des Niederschlags und Entfernung überschüssigen Substrats durch Waschen wurden die Reaktionsprodukte unter alkalischen Bedingungen durch Spaltung des Thioesters freigesetzt. Die Proben wurden dann aufgearbeitet und per HPLC-MS analysiert. Im Laufe einer Verfeinerung des Assays wurden Proben nach möglichst kurzer Inkubationszeit



entnommen und die Mengen an freigesetzten diastereomeren L- und D-Peptiden anhand der relativen Massensignalintensitäten mit den entsprechenden späteren Zeitpunkte verglichen. Es wurde deutlich, dass die Beladungsreaktion bereits nach 15 s – dem niedrigsten erfassbaren Zeitpunkt – praktisch vollständig abgelaufen war.

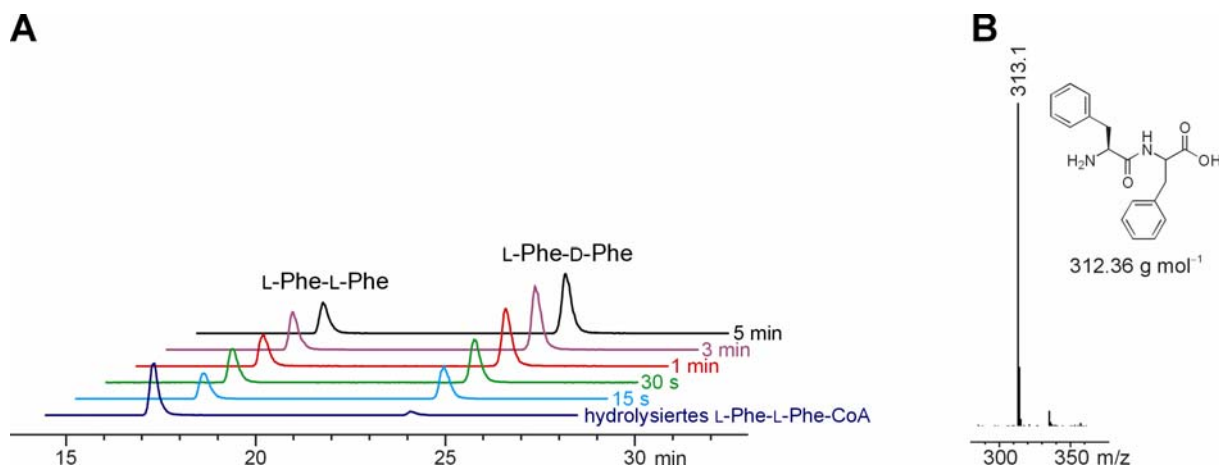


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
L-Phe	L-Phe	<b>2</b> FF-CoA
L-Phe	D-Phe	<b>3</b> Ff-CoA
L-Phe	L-Tyr	<b>4</b> FY-CoA
L-Phe	L-p-fluoro-Phe	<b>5</b> F(p-fluoro)F-CoA
L-Phe	L-Trp	<b>6</b> FW-CoA
L-Phe	L-Leu	<b>7</b> FL-CoA
L-Phe	L-Asn	<b>8</b> FN-CoA
L-Phe	L-Ser	<b>9</b> FS-CoA
L-Phe	L-Thr	<b>10</b> FT-CoA
L-Phe	L-Asp	<b>11</b> FD-CoA
L-Phe	L-His	<b>12</b> FH-CoA
L-Phe	L-Lys	<b>13</b> FK-CoA
L-Ser	L-Phe	<b>14</b> SF-CoA
L-Phe	L-Pro	<b>15</b> FP-CoA
L-Phe	N-Me-L-Phe	<b>16</b> FMeF-CoA



**Abbildung 5-4** Zusammenstellung aller für diese Arbeit synthetisierter Peptidyl-CoAs. Verbindung **1** stellt das Analogon des nativen Substrats für TycB<sub>3</sub>-E dar und **2** das entsprechend verkürzte Dipeptidyl-CoA. Bei **3** wurde das C-terminale Phe (**R**<sub>2</sub>) in der D-Konfiguration eingebaut. In den Verbindungen **4–13** wurde **R**<sub>2</sub> variiert, während **R**<sub>1</sub> (Phe) konstant gehalten wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei CoA **14** für **R**<sub>2</sub> Phe beibehalten und Ser für **R**<sub>1</sub> gewählt. Die Verbindungen **15–17** waren für die Untersuchung der Toleranz von E-Domänen gegenüber N-methylierten Substraten entworfen worden.

Wurde Sfp in der Reaktionsmischung weggelassen, konnte keine detektierbare Menge eines Peptids über die beschriebene Aufarbeitung wiedergewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Die aus der Epimerisierungsreaktion hervorgehenden Diastereomere konnten per *reversed phase* HPLC (s. 4.5.2.1) gut getrennt werden (s. Abbildung 5-5). Durch Integrieren der Flächen entsprechend aus dem Gesamtspektrum extrahierter Massensignale konnten darauf die relativen Verhältnisse von L- zu D-Isomer leicht berechnet werden. Somit entfiel auch die Notwendigkeit eines internen Standards zur Quantifizierung.



**Abbildung 5-5** HPLC-MS-Analyse vom Ppant-PCP-E hydrolysierten Peptide. Als Beispiel wurde die Reaktion von TycB<sub>3</sub>-PCP-E mit Sfp und FF-CoA (**2**) gewählt. Nach Beladung des Proteins mit dem Substrat unter Katalyse durch Sfp wurde die Reaktion in zeitlicher Abhängigkeit durch Verwendung von 10% TCA beendet. Über eine Thioesterspaltung mit 0.1 M KOH wurden die Reaktionsprodukte freigesetzt und per HPLC aufgetrennt. (A) zeigt Chromatogramme der extrahierten [M + H]<sup>+</sup>-Massensignale für die getrennten Epimerisierungsprodukte L-Phe-L-Phe und L-Phe-D-Phe. Die Spuren illustrieren die Analyse von hydrolysiertem FF-CoA und von Proben, die zu jeweils entsprechend aufgelisteten Zeitpunkten der Inkubation entnommenen worden sind. (B) zeigt das entsprechende Massensignal zusammen mit Strukturformel und der berechneten theoretischen Neutralmasse.

Dieses Vorgehen ermöglichte, die Bildung invertierter Peptide in zeitlicher Abhängigkeit aufzulösen (s. Abbildung 5-6), wobei der aus bis zu vier unabhängig voneinander bestimmten Zeitkurven abgeschätzte Fehlerbereich bei  $\pm 5\%$  lag. Da an der Gesamtreaktion mehrere katalytische Schritte beteiligt sind und kein echter Produktumsatz stattfindet, wurden aus diesen Daten sogenannte beobachtete Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ -Werte) in Analogie zu den früher beschriebenen radio-dünnschichtchromatographischen Assays [Stachelhaus & Walsh, 2000; Linne *et al.*, 2001] ermittelt.

Der entscheidende Vorteil dieses chemoenzymatischen Ansatzes liegt in der Umgehung der natürlichen Substrataktivierung und Kondensation, was die Beladung jedes denkbaren Peptidvorläufers erlaubt und einen akzeptablen Substratdurchsatz ermöglicht. Es konnte also ein neues Minimalsystem zur Untersuchung der Substratspezifität von E-Domänen etabliert werden.

### 5.1.3 Wahl der Peptidyl-CoAs

Alle für diese Arbeit synthetisierten Peptidyl-CoAs sind in Abbildung 5-4 gezeigt. Zur Vereinfachung wurde für die Darstellung der Aminosäurereste eines Peptids die Ein-

Buchstaben-Abkürzung verwendet, wobei Großbuchstaben für L- und Kleinbuchstaben für D-Aminosäuren stehen (z. B. fPFF-CoA für D-Phe-L-Pro-L-Phe-L-Phe-CoA). Der folgende Abschnitt soll einen Überblick zu den Variationen und den Kriterien für die Auswahl der Vorläufer liefern.

Das Set der synthetisierten CoAs basierte auf der Annahme, dass Peptidyl-E-Domänen hauptsächlich die C-terminale Aminosäure (die direkt über den Thioester gebunden ist und epimerisiert wird) ihres Peptidyl-S-Ppant-Substrats erkennen. Also wurden im Wesentlichen für **R<sub>2</sub>** Veränderungen eingeführt. Obwohl sich bei dem Design an TycB<sub>3</sub>-PCP-E als Beispielsystem orientiert wurde, sollten alle Substrate, wie weiter unten noch genau erläutert wird, auch für die Untersuchung der anderen Konstrukte dienlich sein. CoA **1** (fPFF-CoA) ist eine Mimikry des natürlichen Tetrapeptidyl-Substrats (fPFF-S-Ppant) für TycB<sub>3</sub>-E, und FF-CoA (**2**) soll einen entsprechend verkürzten Substratvorläufer darstellen. Um feststellen zu können, ob das Gleichgewichtsverhältnis nach der Inversion von L zu D mit **2** in gleicher Weise bei der Inversion von D zu L erreicht wird, wurde Ff-CoA (**3**) synthetisiert. Die restlichen CoAs beinhalteten Variationen von aromatischen [FY-CoA, F(p-fluoro)F-CoA, FW-CoA (**4–6**)], aliphatischen [FL-CoA (**7**)], neutralen hydrophilen [FN-CoA, FS-CoA, FT-CoA (**8–10**)], sauren [FD-CoA (**11**)] und basischen [FH-CoA (**12**), FK-CoA (**13**)] Aminosäureresten für **R<sub>2</sub>**. Zur Beurteilung eines Einflusses des N-terminalen Substratteils wurde in SF-CoA (**14**) das C-terminale Phe (**R<sub>2</sub>**) konstant gehalten und **R<sub>1</sub>** zu Ser geändert.

Wie oben erwähnt waren die Peptidyl-CoAs grundsätzlich so gewählt worden, dass sie für die Untersuchung der TycB<sub>3</sub>-E-Domäne (Konstrukt TycB<sub>3</sub>-PCP-E) geeignet waren. Innerhalb ihres natürlichen enzymatischen Umfelds – dem Tyrocidin Biosynthesesystem – epimerisiert diese E-Domäne ein Tetrapeptidyl-Substrat (fPFF-S-Ppant). Um jedoch den Syntheseaufwand und die Einflussfaktoren auf die Reaktion möglichst gering zu halten, erschien es sinnvoll, sich auf die Verwendung von Dipeptidyl-CoAs zu beschränken. Folglich wurde zunächst getestet, ob das verkürzte FF-S-Ppant mit gleicher Effizienz wie das kognate Substrat von L nach D invertiert wird. Dazu wurde der Peptidyl-S-Ppant-Teil der Substrate **1** und **2** mit Hilfe von Sfp auf TycB<sub>3</sub>-PCP-E übertragen und die Epimerisierung wie beschrieben verfolgt. Es zeigte sich, dass sowohl die Geschwindigkeit der Reaktion als auch der Anteil an resultierendem D-Stereomer im Endgleichgewicht in einer vergleichbaren Größenordnung liegen (Daten s. 5.1.4 und Tabelle 5-1). Da also zumindest die beiden N-terminalen Reste des nativen Tetrapeptidyl-Substrats keine signifikante Rolle für die Erkennung bzw. Epimerisierungseffizienz durch die E-Domäne zu spielen schienen, konnte mit dem Einsatz von Dipeptidyl-CoAs als Modell-Substratvorläufer fortgefahren werden.

Das Elongationsmodul FenD<sub>2</sub> katalysiert die Aktivierung und den Einbau von Thr bei der Fengycin-Biosynthese. Daher war es denkbar, dass die in diesem Modul enthaltene E-Domäne (ebenfalls eine Peptidyl-E-Domäne) eine zur TycB<sub>3</sub>-E-Domäne (gehört zu einem Phe-aktivierenden Modul) entgegengesetzte Substratspezifität aufweist. Im natürlichen Verbund des Multienzymsystems invertiert FenD<sub>2</sub>-E genau wie TycB<sub>3</sub>-E ein Tetrapeptidyl-S-Ppant-Substrat: EoYT-S-Ppant (L-Glu-D-Orn-L-Tyr-L-Thr-S-Ppant). Wenn man sich auf die beiden C-terminalen Aminosäurereste dieses Intermediats beschränkt, bliebe als Dipeptidyl-Mimikry für FenD<sub>2</sub>-E das Substrat YT-S-Ppant. Da Tyr ebenso wie Phe zur Gruppe der aromatischen Aminosäuren gehört, erschienen die synthetisierten CoAs gleichermaßen für die Untersuchung dieses Systems geeignet.

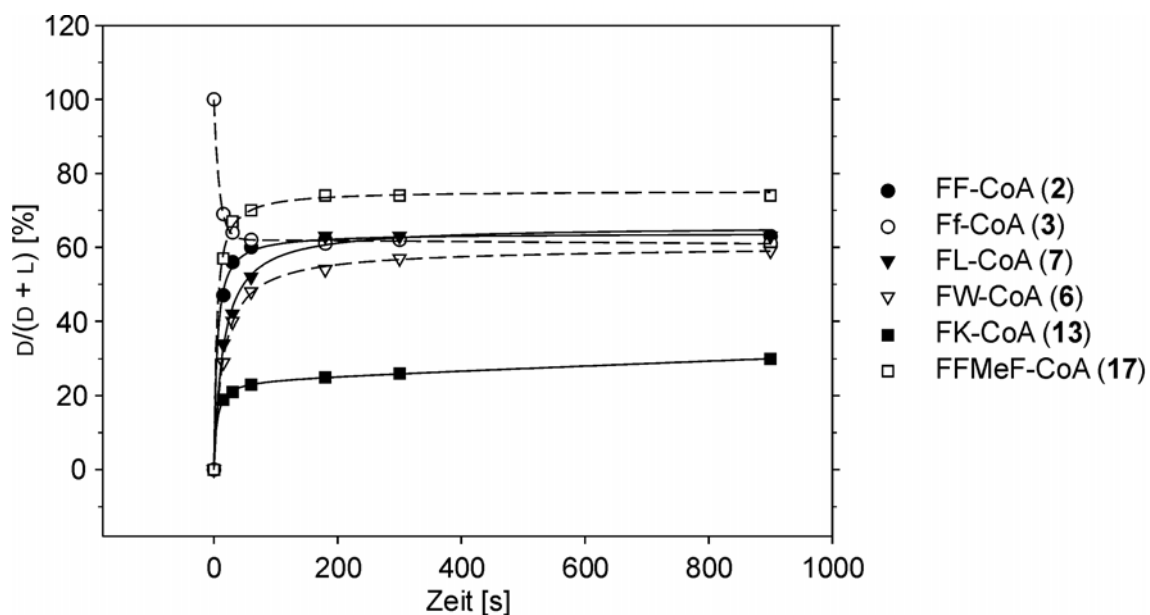
Über die Fähigkeit von E-Domänen aus Initiationsmodulen (Aminoacyl-E-Domänen) zur katalytischen Inversion von Peptidyl-Substraten war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Der hier etablierte chemoenzymatische Ansatz der Fehlbeladung von PCP-E-Domänen mit Peptidyl-CoAs und Sfp bot eine optimale Gelegenheit, die Toleranz der ausgewählten E-Domänen von TycA und GrsA (in Form der Konstrukte TycA- und GrsA-PCP-E, beide E-Domänen empfangen Phe-S-Ppant als kognates Substrat) gegenüber elongierten Substraten zu ermitteln.

Zusätzlich ermöglichte die Verwendung von CoA-Vorläufern die Untersuchung des Verhaltens von E-Domänen gegenüber *N*-methylierten (alkylierten) Peptidyl-Substraten. Dieses war zuvor mit aus dem Actinomycin-Biosynthesesystem generierten Fusionsproteinen getestet worden [Schauwecker *et al.*, 2000], wobei keine invertierten Produkte detektiert werden konnten. Dazu konnte in dieser Arbeit ausschließlich der Tripeptidyl-Vorläufer FMeF-CoA (**17**) verwendet werden, da entsprechende Experimente mit den Dipeptidyl-Substraten FP-CoA (**15**) und FMeF-CoA (**16**) eine extrem schnelle Bildung entsprechender Diketopiperazine (DKPs, vgl. 2.4.1) zur Folge hatten, sobald die Beladung per Sfp auf ein Enzym oder eine Kontrollhydrolyse vorgenommen worden war. Mögliche Gründe dafür sind bekannt [Schwarzer *et al.*, 2001] und werden an späterer Stelle diskutiert.

#### 5.1.4 Epimerisierungsaktivität von TycB<sub>3</sub>- und FenD<sub>2</sub>-PCP-E

Das kognate Substrat von E-Domänen, die nativ in Elongationsmodulen lokalisiert sind (Peptidyl-E-Domänen), ist ein nichtribosomal assembliertes Peptidyl-S-Ppant-Intermediat. Die katalytische Inversion von L nach D (und umgekehrt) betrifft dabei ausschließlich die C-terminale Aminosäure des über einen Thioester enzymgebundenen Substrats. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TycB<sub>3</sub>-E (getestet im Konstrukt TycB<sub>3</sub>-ATE) auch ein L-Phe-S-

Ppant-Substrat akzeptiert und es mit reduzierter Effizienz zu 40% D-Phe im Gleichgewicht epimerisiert [Linne & Marahiel, 2000]. Über die Geschwindigkeit der Inversion des kognaten Substrats (fPFF-*S*-Ppant) war noch nicht berichtet worden, jedoch war bekannt, dass das resultierende L/D-Verhältnis bei etwa 1 : 1 liegen sollte [Clugston *et al.*, 2003]. In dieser Arbeit wurde die Epimerisierungsaktivität der TycB<sub>3</sub>- und FenD<sub>2</sub>-E-Domänen mit verschiedenen Peptidyl-Substraten getestet, um sowohl ein Konzept zur Substrattoleranz entwickeln als auch einen möglichen Einfluss des N-terminalen Substratteils auf die Erkennung durch die Epimerase aufdecken zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst (s. auch Abbildung 5-6 als Beispiel für die Datenerfassung).



**Abbildung 5-6** 2D-Graph zur Illustrierung der Epimerisierungsaktivität am Beispiel von TycB<sub>3</sub>-PCP-E mit verschiedenen Substraten. Nach Beladung des Enzyms mit den entsprechenden Peptidyl-*S*-Ppant-Abschnitten der in der Legende neben dem Graphen gezeigten CoAs durch Sfp wurden die Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10% TCA beendet. Die Produkte wurden durch alkalische Thioesterspaltung freigesetzt und nach Aufarbeitung per HPLC-MS analysiert. Der relative Anteil der Diastereomere wurde quantifiziert und die prozentuale Bildung der D(R<sub>2</sub>)-Peptide in zeitlicher Abhängigkeit dargestellt.

Wie bereits weiter oben erwähnt zeigte sich bei ersten Untersuchungen mit dem Didomänen-Protein TycB<sub>3</sub>-PCP-E, dass das kognate Tetrapeptidyl-*S*-Ppant-Substrat und seine verkürzte Dipeptidyl-Mimikry gleich schnell epimerisiert werden (beide 1.9 min<sup>-1</sup>), wobei auch die im Endgleichgewicht gefundenen D-Anteile der freigesetzten Produkte in vergleichbaren Bereichen lagen (fPff: 56%, Ff, 63%). Bei identischer Geschwindigkeit wurde durch TycB<sub>3</sub>-PCP-E nach Beldadung mit Ff-CoA (3) von D nach L zu praktisch demselben

Gleichgewicht (61% rückgewonnenes Ff) invertiert. Durch Verwendung der Vorläufer FY-CoA (**4**) und F(p-fluoro)F-CoA (**5**) konnte eine unveränderte Toleranz von TycB<sub>3</sub>-E gegenüber sogar ungewöhnlich substituierten Phe-Analoga an C-terminaler Stelle des Substrats nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite wurde eine verminderte Aktivität ( $1.2 \text{ min}^{-1}$ ) beobachtet, als die Reaktion mit FW-CoA (**6**) durchgeführt wurde, was darauf hinwies, dass keine generelle Bevorzugung von aromatischen Aminosäuren für **R**<sub>2</sub> herrscht. Der sterische Anspruch von Trp könnte für die Verlangsamung der Inversion, die dennoch im Gleichgewicht bei 59% Fw endete, verantwortlich sein. Ähnlich beeinträchtigten andere Variationen für **R**<sub>2</sub> die Epimerisierungsgeschwindigkeit [ $1.2\text{--}1.5 \text{ min}^{-1}$  bei Verwendung von FL-CoA (**7**), FN-CoA (**8**) und FS-CoA (**9**)], jedoch war die Gleichgewichtsposition unverändert ( $\sim 60\%$  D-Isomer in allen Fällen). Ein vergleichbares Resultat wurde nach Beladung mit SF-CoA (**14**) erhalten, was die Vermutung nahe legt, dass auch die zweite (N-terminale) Aminosäure (**R**<sub>1</sub>) des Peptidyl-S-Ppant-Substrats zu einem gewissen Ausmaß bei der Erkennung durch die E-Domäne eine Rolle spielt. Vom Enzym freigesetzte Peptide nach entsprechenden Epimerisierungsassays mit den S-Ppant-Vorläufern FD-CoA (**11**) und FH-CoA (**12**) ließen lediglich eine qualitative Aussage nach der beschriebenen HPLC-MS-Analytik zu. Zwar war es möglich invertierte Produkte zu detektieren, jedoch erlaubten eine zu geringe Auftrennung der Diastereomere und eine niedrige Signalqualität keine Quantifizierung der Ergebnisse. Die auffälligste Erniedrigung in der Epimerisierungseffizienz wurde bei Durchführung der Reaktion mit FK-CoA (**13**) beobachtet ( $0.8 \text{ min}^{-1}$ ), wobei gleichzeitig ein großer Unterschied im D-Anteil (30% Fk) der abgespaltenen Peptide im Endgleichgewicht zu verzeichnen war. Ein geladener Aminosäurerest an Position **R**<sub>2</sub> scheint also einen Einfluss auf die Substraterkennung oder eine korrekte Bindung in der aktiven Tasche des Enzyms zu haben. Zugleich wird eine eingeschränkte Substrattoleranz von TycB<sub>3</sub>-E deutlich.

Da FenD<sub>2</sub>-E nativ zu einem Modul gehört, welches Thr aktiviert und bei der Fengycin-Biosynthese einbaut [Lin *et al.*, 1999], ist davon ausgegangen worden, dass diese Epimerase eine Präferenz für Substrate mit hydrophilen C-terminalen (**R**<sub>2</sub>) Aminosäureresten besitzt. Trotzdem lag die Effizienz der katalytischen Inversion von fPFF-S-Ppant ( $1.8 \text{ min}^{-1}$ , 56% fPFf) nach Beladung von FenD<sub>2</sub>-PCP-E mit **1** in einer mit der Aktivität von TycB<sub>3</sub>-PCP-E (s. o.) vergleichbaren Größenordnung. Überraschenderweise wurde bei Verwendung der Peptidyl-CoAs mit C-terminalen Variationen aromatischer Aminosäuren (**2-5**) eine nur leicht verminderte Epimerisierungsaktivität [ $1.5\text{--}1.8 \text{ min}^{-1}$ , etwa 60% freigesetzte D(**R**<sub>2</sub>)-Peptide] gegenüber den entsprechend mit TycB<sub>3</sub>-PCP-E ermittelten Werten festgestellt. Jedoch hatte auch in diesem System Trp an Position **R**<sub>2</sub> des Substrats [Beladung mit FW-CoA (**6**)] eine

Einschränkung der katalytischen Inversion ( $0.8 \text{ min}^{-1}$ ) bei konstantem Endgleichgewicht von 55% Fw zur Folge. Entgegen aller Erwartungen gab es keine Hinweise für eine bevorzugte Reaktion von FenD<sub>2</sub>-E mit Substraten, die an C-terminaler Position (**R**<sub>2</sub>) Variationen von hydrophilen und aliphatischen Aminosäuren tragen [Verwendung von FN-CoA (**8**) und FL-CoA (**7**):  $1.2\text{--}1.3 \text{ min}^{-1}$ , 55% der rückgewonnenen Peptide in D-Form], lediglich FS-S-Ppant [Beladung mit FS-CoA (**9**)] wurde hier effizienter invertiert ( $1.8 \text{ min}^{-1}$ , 61% Fs) als durch TycB<sub>3</sub>-E (s. o.).

**Tabelle 5-1** Ergebnisse der Epimerisierungsassays

Substrat-Vorläufer <sup>a</sup>	Didomänen-System							
	TycB <sub>3</sub> -PCP-E		FenD <sub>2</sub> -PCP-E		TycA-PCP-E		GrsA-PCP-E	
	<i>k</i> <sub>obs</sub> [min <sup>-1</sup> ]	D/(D + L) [%] <sup>b</sup>	<i>k</i> <sub>obs</sub> [min <sup>-1</sup> ]	D/(D + L) [%]	<i>k</i> <sub>obs</sub> [min <sup>-1</sup> ]	D/(D + L) [%]	<i>k</i> <sub>obs</sub> [min <sup>-1</sup> ]	D/(D + L) [%]
<b>1</b> fPFF-CoA	1.9	56	1.8	56	1.0	59	1.5	62
<b>2</b> FF-CoA	1.9	63	1.6	58	1.8	54	1.7	55
<b>3</b> Ff-CoA	1.9	61	1.6	58	1.8	71	1.7	61
<b>4</b> FY-CoA	2.0	62	1.5	62	2.0	60	> 2.0	60
<b>5</b> F(p-fluoro)F-CoA	1.9	63	1.8	56	1.9	58	1.7	54
<b>6</b> FW-CoA	1.2	59	0.8	55	0.8	35	1.3	46
<b>7</b> FL-CoA	1.4	63	1.3	58	1.4	60	1.3	60
<b>8</b> FN-CoA	1.2	60	1.2	59	1.9	68	1.9	68
<b>9</b> FS-CoA	1.5	60	1.8	61	> 2.0	63	> 2.0	68
<b>10</b> FT-CoA	n. b. <sup>c</sup>	n. b.	1.3	41	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<b>11</b> FD-CoA	+ <sup>d</sup>	n. b.	+	n. b.	+	n. b.	+	n. b.
<b>12</b> FH-CoA	+	n. b.	+	n. b.	+	n. b.	+	n. b.
<b>13</b> FK-CoA <sup>e</sup>	0.8	30	0.9	26	1.0	52	0.9	54
<b>14</b> SF-CoA	1.5	59	0.9	55	> 2.0	52	1.7	49
<b>15</b> FP-CoA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<b>16</b> FMeF-CoA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
<b>17</b> FFMeF-CoA	> 2.0	74	> 2.0	70	1.6	71	> 2.0	68

<sup>a</sup> Die Strukturen der Peptidyl-CoAs sind in Abbildung 5-4 gezeigt. <sup>b</sup> Das Gleichgewicht wurde nach 15 min Inkubation ermittelt. <sup>c</sup> Die Abkürzung n. b. steht für: nicht bestimmt. <sup>d</sup> Ein + bedeutet, dass eine Epimerisierungsaktivität festgestellt, aber aus analytischen Gründen nicht quantifiziert werden konnte.

<sup>e</sup> Als Folge der basischen Aufarbeitung wurden hier nicht die linearen Peptide FK und Fk detektiert, sondern entsprechend zyklische Produkte, die aus dem nucleophilen Angriff der Lys-ε-Aminogruppe auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Peptidyl-S-Ppant-Thioesters hervorgingen. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die beobachtete C<sub>α</sub>-Stereochemie.

Erstaunlich war deshalb die im Vergleich dazu verminderte Reaktivität ( $1.3 \text{ min}^{-1}$ ) mit der Dipeptidyl-Mimikry des kognaten Substrats FT-S-Ppant nach Beladung mit FT-CoA (**10**), wobei die Epimerisierung in nur 41% detektiertem Ft im Gleichgewicht resultierte. Augenscheinlich ist die Substrattoleranz von Peptidyl-E-Domänen nicht zwangsläufig konform mit der Spezifität des Moduls, in das sie im nativen enzymatischen Umfeld eingebunden sind. Eine Aktivität nach Verwendung von FD-CoA (**11**) und FH-CoA (**12**) konnte auch hier festgestellt, aber aus den oben genannten Gründen nicht quantifiziert werden. Genau wie zuvor bei Experimenten mit TycB<sub>3</sub>-PCP-E beobachtet war auch die katalytische Epimerisierung durch FenD<sub>2</sub>-E im Assay mit FK-CoA (**13**) stark beeinträchtigt ( $0.9 \text{ min}^{-1}$ , 26% Fk). Eine verlangsamte Reaktion ( $0.9 \text{ min}^{-1}$ ) war auch die Folge, als SF-CoA (**14**) eingesetzt worden war, wobei im Endgleichgewicht 55% vom Enzym gelöstes Sf detektiert wurden. Hier könnte die Katalyse dadurch eingeschränkt sein, dass an beiden Positionen des Substrats nicht kognate Aminosäuren positioniert sind, was die Vermutung eines Einflusses der beiden C-terminalen Reste auf die Erkennung durch die E-Domäne bzw. die Inversions-effizienz zulässt.

### 5.1.5 Epimerisierungsaktivität von TycA- und GrsA-PCP-E

Das kognate Substrat von in Initiationsmodulen enthaltenen E-Domänen (Aminoacyl-E-Domänen) ist ein PCP-gebundenes Aminoacyl-S-Ppant-Intermediat. Es ist darüber berichtet worden, dass die E-Domänen von TycA und speziell GrsA – diese Epimerase wurde unter anderem mit *rapid quench*-Methoden genau untersucht – sehr effiziente Enzyme darstellen und ein L-Phe-S-Ppant ausgesprochen schnell bis zu einem Verhältnis D-/L-Phe-S-Ppant von 2 : 1 im Endgleichgewicht invertieren [Stachelhaus & Walsh, 2000; Linne *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001]. Dennoch gab es bis zu Beginn dieser Arbeit keine Antwort darauf, ob die Funktion einer solchen Aminoacyl-E-Domäne durch die Stellung innerhalb eines NRPS-Systems bestimmt wird oder ob die Substratspezifität dieser Epimerasen tatsächlich Unterschiede zu der von Peptidyl-E-Domänen aufweist. Eine Beladung der entsprechenden PCP-E-Konstrukte von TycA und GrsA mit dem Peptidyl-S-Ppant-Anteil modifizierter CoAs erschien ideal für die Bearbeitung dieser Fragestellung, und tatsächlich konnte eine Aktivität der Aminoacyl-E-Domänen mit elongierten Substraten nachgewiesen werden, was einen großen Spielraum für zukünftige biokombinatorische Ansätze vermuten ließ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 zusammenfassend dargestellt.

Generell verhielten sich die ausgewählten E-Domänen (TycA-E und GrsA-E) bei den Epimerisierungsassays sehr ähnlich. Beide konnten FF-S-Ppant [nach Beladung mit FF-

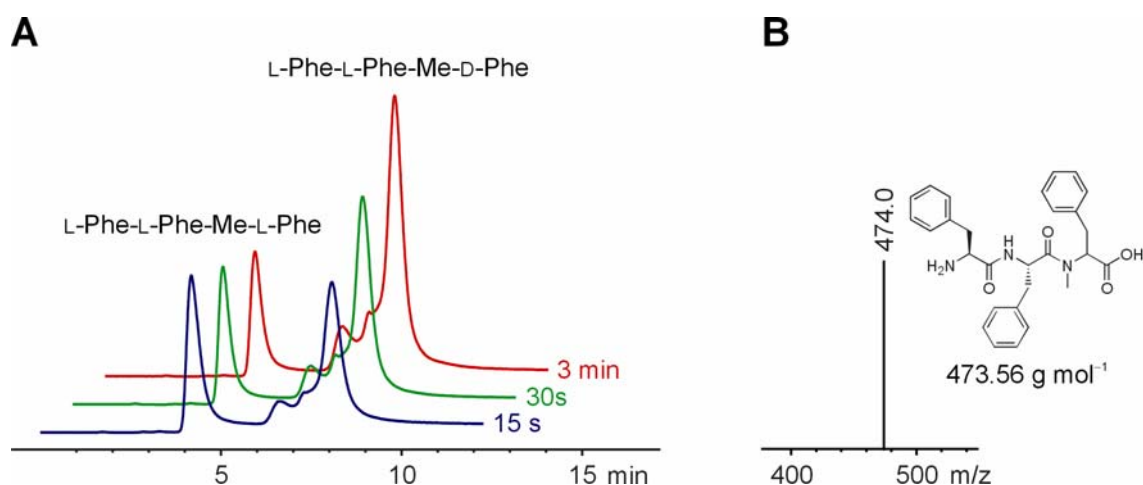


CoA (2)] mit fast gleicher Effizienz wie TycB<sub>3</sub>-E invertieren (TycA-PCP-E: 1.8 min<sup>-1</sup>, GrsA-PCP-E: 1.7 min<sup>-1</sup>) und equilibrierten zu einem im Vergleich mit TycB<sub>3</sub>-PCP-E und der Reaktion mit ihrem kognaten Phe-Substrat (s. o.) leicht geringeren D-Anteil (ca. 55% freigesetztes Ff). Allerdings wurde eine verschobene Gleichgewichtsposition nach Epimerisierung von D zu L bei Verwendung von Ff-CoA (3) im Assay mit den PCP-E-Didomänen vorgefunden (TycA: 71% Ff, GrsA: 61% Ff). Des weiteren lies sich ein Einbruch der katalytischen Effizienz bei der Reaktion mit längeren Peptidyl-Substraten – hier nach Beladung mit fPFF-CoA (1) – beobachten (TycA: 1.0 min<sup>-1</sup>, GrsA: 1.5 min<sup>-1</sup>), wobei das im Gleichgewicht erreichte L/D-Verhältnis zwischen den Reaktionsprodukten nicht betroffen war (um 60% D-Isomer). Obwohl die getesteten Aminoacyl-E-Domänen eine Aktivität mit Peptidyl-Substraten zeigten, wich ihre Toleranz gegenüber bestimmten S-Pant-Intermediaten von der der Peptidyl-E-Domänen ab. Beide Konstrukte invertierten FY-S-Pant (Verwendung von CoA 4) sehr effizient (etwa 2.0 min<sup>-1</sup>) zu 60% Fy-S-Ppant im Endgleichgewicht und akzeptierten F(p-fluoro)F-S-Ppant (Verwendung von CoA 5) in ähnlicher Weise. Hier zeigte sich bei Einsatz von FW-CoA (6) im Assay nicht nur ein Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit (TycA: 0.8 min<sup>-1</sup>, GrsA: 1.3 min<sup>-1</sup>) sondern gleichermaßen auf die Menge des entsprechend gebildeten D-Isomers (TycA: 35% Fw, GrsA: 46% Fw). Die Aminoacyl-E-Domänen scheinen durch den sperrigen Trp-Rest in C-terminaler (**R**<sub>2</sub>) Position des Substrats noch stärker gestört zu werden als die zuvor untersuchten Peptidyl-E-Domänen. Mit TycB<sub>3</sub>- und FenD<sub>2</sub>-E vergleichbare Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit (1.3–1.4 min<sup>-1</sup>) und das Endgleichgewicht (etwa 60% D-Form) wurden bei der Inversion von FL-S-Ppant [Assay mit FL-CoA (7)] beobachtet. Im Gegensatz zu TycB<sub>3</sub>-E scheinen TycA- und GrsA-E toleranter gegenüber hydrophilen Aminosäureresten an **R**<sub>2</sub>-Position zu sein, was sich in einer hohen Aktivität mit FN- (sowohl TycA als auch GrsA: 1.9 min<sup>-1</sup>, 68% Fn im Gleichgewicht) und FS-S-Ppant-Intermediaten (beide Enzyme > 2.0 min<sup>-1</sup>, TycA: 63% Fs, GrsA: 68% Fs) nach Beladung mit den entsprechenden CoAs widerspiegelte. Auch mit diesen PCP-E-Didomänen konnte eine Inversion bei Verwendung von FD-CoA (11) und FH-CoA (12) detektiert, aber die Ergebnisse aus den oben genannten Gründen nicht quantifiziert werden. Genau wie zuvor bei der Untersuchung der Peptidyl-E-Domänen zeigten auch TycA- und GrsA-E eine verminderte Inversionsgeschwindigkeit (TycA: 1.0 min<sup>-1</sup>, GrsA: 0.9 min<sup>-1</sup>) nach Beladung mit FK-CoA (13), jedoch war der im Endgleichgewicht vorgefundene Anteil an D-Isomer hier erhöht (TycA: 52% Fk, GrsA: 54% Fk). Demnach scheinen die untersuchten Aminoacyl- anders als die Peptidyl-E-Domänen geladene Aminosäuren an C-terminaler Position (**R**<sub>2</sub>) des Substrats besser koordinieren und epimerisieren zu können. Die Effizienz

der Epimerisierung von SF-*S*-Ppant [nach Beladung mit SF-CoA (**14**)] wies Unterschiede zu den entsprechenden Experimenten mit FF-CoA auf (TycA:  $> 2.0 \text{ min}^{-1}$ , GrsA:  $1.7 \text{ min}^{-1}$ , etwa 50% freigesetztes Sf in beiden Fällen). Da die beobachteten Abweichungen in etwa der gleichen Größenordnung lagen wie bei Durchführung des Assays mit FS-CoA (**9**), war dies ein Hinweis darauf, dass Veränderungen an beiden Seitenkettenpositionen (**R**<sub>1</sub> bzw. **R**<sub>2</sub>) der verwendeten Dipeptidyl-Substrate in ähnlichem Umfang einen Einfluss auf die Epimerisierungsaktivität von Aminoacyl-E-Domänen haben können.

### 5.1.6 Epimerisierungsaktivität mit *N*-methylierten Substraten

In einer bereits erschienenen Studie, bei der entsprechende Fusionsproteine erzeugt und charakterisiert worden waren [Schauwecker *et al.*, 2000], verblieb die Kompatibilität von E-Domänen im Zusammenhang mit einer vorausgehenden *N*-Methylierung des enzymgebundenen *S*-Ppant-Substrats in Frage gestellt. Theoretisch dürfte eine Methylierung (Alkylierung) des Peptidbindung-Amid-N-Atoms im Peptidyl-*S*-Ppant die für die katalytische Inversion notwendige C<sub>α</sub>-Proton-Abstraktion nicht wesentlich behindern. Obwohl eine mögliche produktive Interaktion von E-Domänen mit M-Domänen auf enzymatischer Stufe im Unklaren bleibt, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine generelle Aktivität von E-Domänen mit *N*-methylierten Peptidyl-*S*-Ppant-Substraten gezeigt werden.



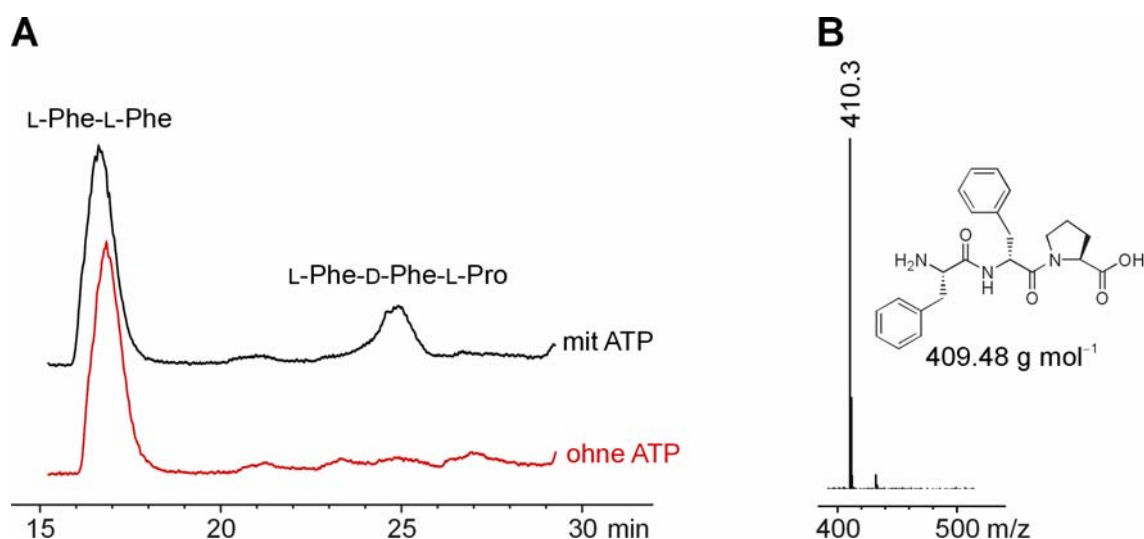
**Abbildung 5-7** Trennung der *N*-methylierten Tripeptide FFMeF und FFMeF durch chirale HPLC. Das Beispiel illustriert die Analyse von TycB<sub>3</sub>-PCP-E freigesetzter Produkte, wobei die Reaktionen zu den jeder Spur zugeordneten Zeitpunkten beendet worden waren. (A) zeigt die SIM-extrahierten [M + H]<sup>+</sup>-Signale. (B) zeigt das entsprechende Massensignal zusammen mit Strukturformel und der berechneten theoretischen Neutralmasse.

Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 5-1 zusammengefasst. Da in diesem Fall die freigesetzten Reaktionsprodukte über eine gängige C18-reversed phase HPLC-Säule nicht aufgetrennt werden konnten, wurde die Analytik alternativ mit einer chiralen Säule und Massendetektion in SIM- (*single ion mode*-) Einstellung (s. Abschnitt 4.5.2.1) vorgenommen (Abbildung 5-7). Nach der Beladungsreaktion unter Verwendung des Substratvorläufers FFMef-CoA (**17**, L-Phe-L-Phe-N-Me-L-Phe-CoA) auf die PCP-E-Domänenkonstrukte wurde das N-methylierte S-Ppant-Intermediat von allen vier Enzymen mit hoher Effizienz invertiert ( $> 2.0 \text{ min}^{-1}$ , lediglich TycA-PCP-E zeigte mit  $1.6 \text{ min}^{-1}$  eine etwas niedrigere Aktivität). Hinzukommend wurden hohe D-Anteile (FFMef) bei den freigesetzten Reaktionsprodukten nach Einstellung des Gleichgewichts ermittelt (in allen Fällen etwa 70% FFMef). Offensichtlich sind E-Domänen mit dieser Klasse von Intermediaten kompatibel, wobei sich die N-Methylierung des Peptidyl-S-Ppant-Substrats auf die katalytische Inversion sogar begünstigend auszuwirken scheint.

## 5.2 Elongation von Peptidyl-Substraten durch die TycB<sub>1</sub>-C-Domäne

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass E-Domänen aus Initiationsmodulen (Aminoacyl-E-Domänen) prinzipiell dazu in der Lage sind, auch Peptidyl-S-Ppant-Substrate anstelle des kognaten Aminoacyl-Intermediats katalytisch zu invertieren. Für die Evaluation dieses Ergebnisses im Zusammenhang mit biokombinatorischen Ansätzen zur Entwicklung hybrider NRPS war es nun interessant herauszufinden, ob auch die im nativen System entsprechend auf ein Initiationsmodul folgende und mit der Aminoacyl-E-Domäne interagierende C-Domäne ebenso PCP-gebundene Peptidyl-Intermediate akzeptieren und elongieren kann. Es ist bereits gezeigt worden, dass die stromaufwärts (*upstream*) gelegene elektrophile Donor-Bindungstasche der TycB<sub>1</sub>-C-Domäne eine relaxierte Substratspezifität in Bezug auf eintretende Aminoacyl-Intermediate offen legt. Dennoch ist dieser Teil der C-Domäne hoch enantioselektiv und akzeptiert in signifikant höherem Maße die D-Konfiguration vom vorangehenden Modul übertragener Substrate [Belshaw *et al.*, 1999; Ehmann *et al.*, 2000]. Zudem war bereits bekannt, dass C-Domänen aus Elongationsmodulen auch Aminoacyl-Substrate prozessieren [Linne & Marahiel, 2000] können. Der hier etablierte chemoenzymatische Ansatz zur Charakterisierung von E-Domänen bot gleichzeitig eine gute Möglichkeit das Wissen um die Substratspezifität von C-Domänen zu erweitern, wobei die bekannte und gut untersuchte Interaktion zwischen TycA und TycB<sub>1</sub> [Stachelhaus *et al.*, 1998] ausgenutzt wurde. Wie im Folgenden beschrieben konnte dabei eine Toleranz der TycB<sub>1</sub>-C-

Domäne gegenüber Peptidyl-S-Ppant-Intermediaten aufgedeckt werden (zum Assay s. auch Abschnitt 4.4.2.2). Dazu wurde TycA-PCP-E mit dem Peptidyl-S-Ppant-Teil verschiedener CoA-Derivate unter Katalyse durch Sfp beladen und zur Epimerisierung der gebundenen Substrate präinkubiert. In einem getrennten Ansatz wurde das Akzeptorenzym TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>, das als geeignet für eine schnelle Produktfreisetzung angesehen und deshalb ausgewählt worden war [Schwarzer *et al.*, 2001], zur Aktivierung und kovalenten Bindung von L-Pro präinkubiert. Die Produktbildungsreaktion (*single turnover*) wurde darauf durch Vermischen gleicher Volumina beider Proteinlösungen initiiert und durch Enzympräzipitation mit der Zugabe von Methanol nach 1 h beendet. Im Überstand enthaltene Produkte wurden nach entsprechender Probenvorbereitung per HPLC-MS analysiert. Eine Übersicht aller detektierten Peptidprodukte – wie sie nach der Kondensation mit Pro erwartet worden sind – ist in Tabelle 5-2 zusammengestellt.



**Abbildung 5-8** HPLC-Analyse durch die TycB<sub>1</sub>-C-Domäne elongierter Peptidyl-Substrate. (A) zeigt als Beispiel die Bildung des Tripeptids FfP. Dazu wurde TycA-PCP-E mit FF-CoA (**2**) und Sfp beladen, bekam Zeit das Substrat zu equilibrieren und wurde dann zur Reaktion mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>, das zur Aktivierung und Bindung von Pro präinkubiert worden war, zusammengebracht. Das detektierte FF ging vermutlich aus der *in trans*-Reaktion der Thioesterase von TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> mit FF-CoA hervor. TycB<sub>1</sub>-C akzeptierte und elongierte Ff-S-Ppant zur Bildung von FfP (schwarze Spur), das vom Akzeptorenzym freigesetzt wurde und durch Detektion des entsprechend in (B) gezeigten [M + H]<sup>+</sup>-Massensignals identifiziert werden konnte. Kein Tripeptidprodukt wurde detektiert, wenn ATP im Assay weggelassen wurde (rote Spur). (B) zeigt außerdem die Strukturformel und die berechnete theoretische Neutralmasse des Tripeptids FfP.

War die Beladung von TycA-PCP-E mit FF- oder Ff-CoA (**2** und **3**) durchgeführt und die Peptide im Anschluss zur Elongation auf TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> transferiert worden, wurde

jeweils nur ein (das gleiche) Produkt erhalten. Dabei handelte es sich in beiden Fällen dem detektierten Massensignal von  $410.3 \text{ g mol}^{-1}$  ( $[M + H]^+$ ) nach um das erwartete Tripeptid L-Phe-**D**-Phe-L-Pro (FfP). Kein Produkt konnte hingegen detektiert werden, wenn ATP in der Akzeptor-Reaktionsmischung weggelassen wurde (s. Abbildung 5-8). Diese Negativkontrolle bestätigte die enzymatische Bildung der gefundenen Peptide. Die Bildung jeweils nur eines bestimmten Produkts mit erwarteter Masse wurde gleichermaßen bei der Prozessierung durch TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> von TycA-PCP-E übertragener Peptide nach Beladung mit FL- und fPFF-CoA (**7** und **1**) beobachtet. TycB<sub>1</sub>-C ist somit fähig, diese Peptidyl-S-Pant-Substrate bis zu einer Länge von vier Aminosäuren (CoA **1** war der längste in dieser Arbeit verwendete Substratvorläufer) zu akzeptieren und zu elongieren. Obwohl zum stereochemischen Vergleich der gebildeten Tri- und Pentapeptide keine synthetischen Standardverbindungen zur Verfügung standen, kann aus der Detektion jeweils nur eines Produkts geschlossen werden, dass die Stereoselektivität der Donor-Bindungstasche komplett erhalten bleibt, wenn TycB<sub>1</sub>-C die bislang genannten Peptidyl-Intermediate prozessiert.

**Tabelle 5-2** Identifikation der Produkte nach Elongation von Peptidyl-S-Pant-Intermediaten untersucht im System TycA/TycB<sub>1</sub>

Substratvorläufer für TycA-PCP-E <sup>a</sup>	Erwartetes Produkt	Ionisierungsmethode	Spezies	Gemessene Masse (berechnete Masse) [g mol <sup>-1</sup> ]
FF-CoA ( <b>2</b> )	FfP	ESI	$[M + H]^+$	410.3 (410.2)
Ff-CoA ( <b>3</b> )	FfP	ESI	$[M + H]^+$	410.3 (410.2)
FL-CoA ( <b>7</b> )	FfP	ESI	$[M + H]^+$	376.3 (376.2)
FS-CoA ( <b>9</b> )	FsP	ESI	$[M + H]^+$	350.1 <sup>b</sup> (350.2)
FT-CoA ( <b>10</b> )	FtP	ESI	$[M + H]^+$	n. d. <sup>c</sup> (364.2)
FK-CoA ( <b>13</b> )	FkP	ESI	$[M + H]^+$	n. d. (391.2)
SF-CoA ( <b>14</b> )	SfP	ESI	$[M + H]^+$	350.1 <sup>d</sup> (350.2)
fPFF-CoA ( <b>1</b> )	fPFfP	ESI	$[M + H]^+$	654.3 (654.3)

<sup>a</sup> Die Strukturen aller CoA-Derivate sind in Abbildung 5-4 zu sehen. <sup>b</sup> Hier wurde ein 1: 1-Produktgemisch (vermutlich FsP/FSP) detektiert. <sup>c</sup> Die Abkürzung n. d. steht für: nicht detektiert. <sup>d</sup> Hier wurde ein 5.4 : 1-Produktgemisch (vermutlich SfP/SFP) detektiert.

Es ergaben sich aber auch Hinweise auf eine Erkennung des C-terminalen S-Pant-Substratteils (thioestergebundene Aminosäure) durch die C-Domäne, wie dies schon zuvor bei Untersuchungen mit E-Domänen der Fall war. So konnte bei Verwendung von FT-CoA (**10**)

und FK-CoA (**13**) im Elongationsassay keine Freisetzung der entsprechenden Produkte mit den erwarteten Massen (FtP:  $[M + H]^+ = 364 \text{ g mol}^{-1}$ , FkP:  $[M + H]^+ = 391 \text{ g mol}^{-1}$ ) durch TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> festgestellt werden. Dies deutete klar darauf hin, dass die Donor-Bindungstasche von TycB<sub>1</sub>-C nicht kognate C-terminale Aminosäuren des vom Donormodul eintreffenden S-Ppant-Substrats diskriminiert. Experimente unter Verwendung anderer CoA-Derivate lieferten Ergebnisse die zwischen den beiden bislang genannten Extrema liegen. Der Assay mit FS-CoA (**9**) resultierte in einem 1 : 1-Gemisch der erwarteten Produkte mit der erwarteten Masse von  $350 \text{ g mol}^{-1}$  ( $[M + H]^+$ ). Scheinbar wurden hier die Diastereomere FsP und FSP zu gleichen Anteilen gebildet. Gleichmaßen wurde ein gebildetes L/D-Produktgemisch (5.4 : 1) nach Transfer von SF-S-Ppant [Beladung von TycA-PCP-E mit SF-CoA (**14**)] auf TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> vorgefunden. Obwohl auch in diesem Fall aufgrund fehlender chemischer Standards die tatsächliche Stereochemie im Unklaren bleibt, wird aus den entsprechenden Ergebnissen des Epimerisierungsassays mit TycA-PCP-E geschlossen, dass SfP (L-Ser-**D-Phe**-L-Phe) den detektierten Anteil von 5.4 (84%) ausmacht. Somit scheint der zweite (N-terminale) Aminosäurerest (**R**<sub>1</sub>) des von TycA-PCP-E übertragenen Peptidyl-S-Ppant-Substrats auch hier weniger in die Erkennung durch das Enzym involviert zu sein und nur einen leichten Einfluss auf die Stereoselektivität der TycB<sub>1</sub>-C-Donor-Bindungstasche auszuüben.

### 5.3 Funktionelle Charakterisierung von E-Domänen

Die in dieser Arbeit chemoenzymatisch auf ihre Substratspezifität untersuchten E-Domänen sind am C-terminalen Ende ihrer Ursprungssynthetasen vorzufinden. Gerade in bakteriellen NRPS-Systemen, die häufig auf mehrere Proteine verteilt sind, spielen E-Domänen in dieser Position eine entscheidende Rolle für die Protein-Protein Erkennung [Linne *et al.*, 2003], da sie die für die spezifische Interaktion verantwortlichen kurzen Kommunikation vermittelnden Domänen (COM-Domänen) [Hahn & Stachelhaus, 2004] beinhalten. Somit sind E-Domänen als Schlüsselstellen bei der Erzeugung von hybriden Peptidsynthetasen anzusehen.

Es war zu Beginn der Untersuchungen bereits bekannt, dass Peptidyl-E-Domänen auch Aminoacyl-Substrate epimerisieren [Linne & Marahiel, 2000], und es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Aminoacyl-E-Domänen sowie entsprechend auf sie folgende C-Domänen auch Peptidyl-Substrate akzeptieren [Stein *et al.*, 2005]. Trotz der Toleranz gegenüber einer Vielzahl von möglichen Reaktionszwischenstufen blieb es unklar, ob C-terminale E-Domänen unbegrenzt gegeneinander austauschbar sind, ohne einen Einfluss

auf den Ablauf der Produktbildung zu nehmen. Die Beantwortung dieser Frage war auch für die Unterscheidung zwischen Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domänen von großer Bedeutung. So setzte sich dieser Teil der vorliegenden Arbeit mit einer Beleuchtung der Funktionalität von E-Domänen im intermodularen Kontext auseinander. Als Assaysystem wurden hierzu rekombinante dimodulare Proteine mit Ursprung in der Tyrocidin-Synthetase B gewählt. Zwei verschiedene Ansätze sollten dann zur Evaluation des Einflusses eines E-Domänenaustauschs auf die katalytische Bildung von Peptiden herangezogen werden. Zunächst war vorgesehen die Dipeptidbildung am zweiten PCP der Enzymderivate durch einen tryptischen Verdau und anschließender ESI-FTICR-MS-Analyse zu untersuchen. Dieses Vorgehen hat für die direkte Untersuchung von enzymgebundenen Reaktionsintermediaten der nichtribosomalen Peptidsynthese (und Polyketidsynthese) sehr stark an Bedeutung gewonnen [Hicks *et al.*, 2004; McLoughlin & Kelleher, 2004; Aron *et al.*, 2005]. Der zweite Ansatz bestand im Ausnutzen eines COM-Domänenaustauschs zur Bestimmung des Einflusses von E-Domänentypen auf die Bildung von Peptid-Produkten in einem *in trans*-Assaysystem.

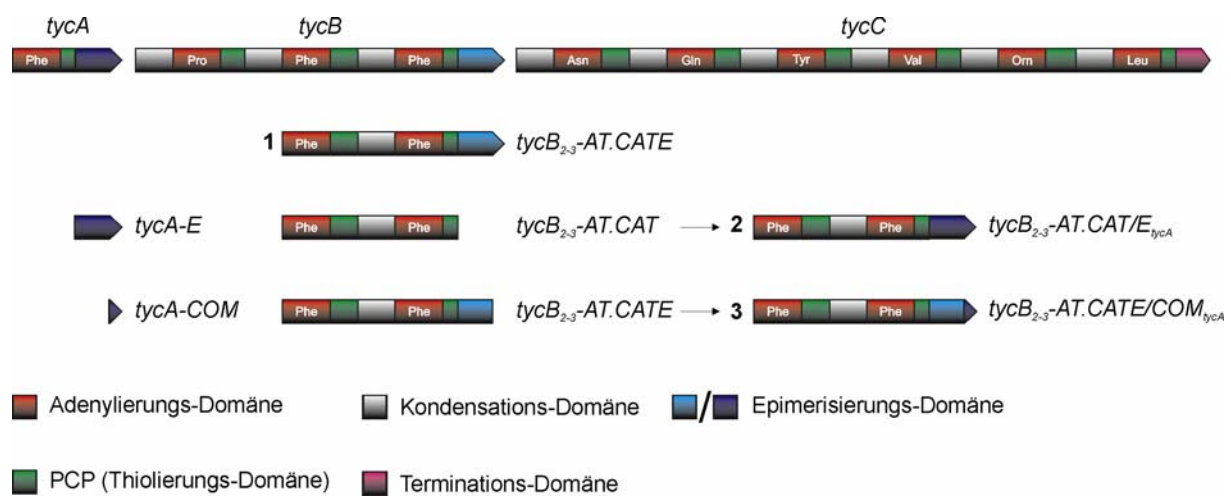
### 5.3.1 Nomenklatur der rekombinanten dimodularen Proteine

Die genetische Abstammung und Domänenzusammensetzung der dimodularen Proteine, die für die Funktionalitätsuntersuchungen konstruiert worden sind, wird in einer speziellen Nomenklatur wiedergegeben. Zum Beispiel entstammt das Hybridenzym TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> dem zweiten und dritten Modul der Tyrocidin-Synthetase B. Es besteht aus der A- und der T-Domäne des Moduls TycB<sub>2</sub> gefolgt von der C-, A- und T-Domäne des Moduls TycB<sub>3</sub> (die Modulgrenze ist durch einen Punkt gekennzeichnet). Dieses Konstrukt ist am C-terminalen Ende kovalent mit der E-Domäne von TycA fusioniert worden (die Fusionsstelle ist durch einen Querstrich gekennzeichnet).

### 5.3.2 Erzeugung und Aufreinigung der rekombinanten dimodularen Proteine

Auf genetischer Ebene wurden Derivate des Proteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (237.5 kDa) [Linne & Marahiel, 2000] erzeugt. Bei der Konstruktion der entsprechenden Expressionsplasmide (s. 4.1.1.2) wurden die für die E-Domäne bzw. die für die COM-Domäne kodierenden Regionen von TycB<sub>3</sub> gegen die jeweiligen von TycA ausgetauscht (Abbildung 5-9). Wie bereits in vorangegangenen Studien gezeigt [Linne *et al.*, 2003; Hahn & Stachelhaus, 2004] sollte dies die beiden so generierten dimodularen Fusionsproteine TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> (238.3 kDa) und TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> (238.1 kDa) prinzipiell dazu befähigen, in einem Elonga-

tionsassay mit TycB<sub>1</sub>-CAT zu interagieren. Wie oben angedeutet wurde also der COM-Domänen austausch eingesetzt, um den funktionellen Vergleich zwischen der Aminoacyl-E-Domäne von TycA und der Peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> in einem erweiterten Modellsystem zu ermöglichen. Alle Gene wurden separat in dem heterologen Wirt *E. coli* M15/pREP4 unter Standardbedingungen bei 25 °C (s. 4.2.1) exprimiert. Durch die Überproduktion der rekombinanten Proteine mit einer C-terminalen His<sub>6</sub>-tag Fusion konnten diese durch einfache Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie (IMAC, s. 4.2.3) gereinigt werden (überprüft durch SDS-PAGE, Daten nicht gezeigt) und waren zur Lagerung bei –80 °C über mehrere Wochen ohne merklichen Aktivitätsverlust geeignet.



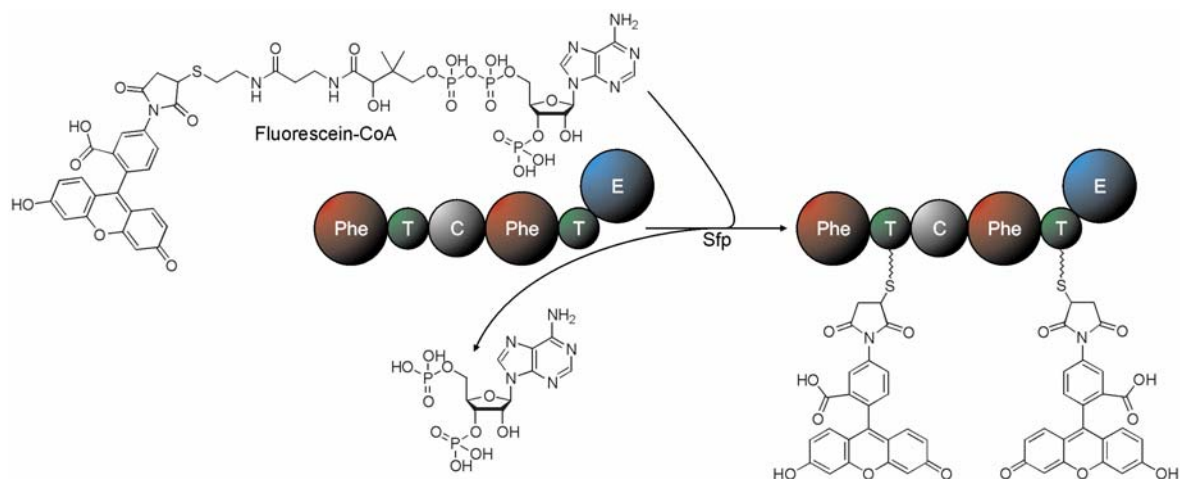
**Abbildung 5-9** Schematische Darstellung des Tyrocidin-Biosynthese-Operons aus *Bacillus brevis* ATCC 8185. Die für die Konstruktion der rekombinanten dimodularen Proteine (1) TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE, (2) TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> und (3) TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> klonierten Genfragmente sind in Beachtung ihrer relativen Lage unterhalb des entsprechenden für die Synthetase TycB kodierenden Abschnitts (*tycB*) gezeigt. Für TycA-E kodierende Genabschnitte sind in dunkelblau eingefärbt, während für TycB<sub>3</sub>-E kodierende Genabschnitte in cyan dargestellt sind.

### 5.3.3 Markierung und Identifizierung tryptischer TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente mit aktivem Serin

Die hoch sensitive massenspektrometrische Analyse von chromatographisch getrennten und fraktionierten proteolytischen Fragmenten ist eine moderne Methode, die die direkte Beobachtung von enzym- (PCP-) gebundenen Zwischenstufen ermöglicht. Da hierbei auch eine zeitliche Verfolgung der katalytischen Bildung solcher Reaktionsintermediate vorgenommen werden kann [McLoughlin & Kelleher, 2004], wurde diese Technik ausgewählt, um die Kinetiken der Dipeptid- (Phe-Phe-) Bildung durch die dimodularen Modellsysteme TycB<sub>2-3</sub>-



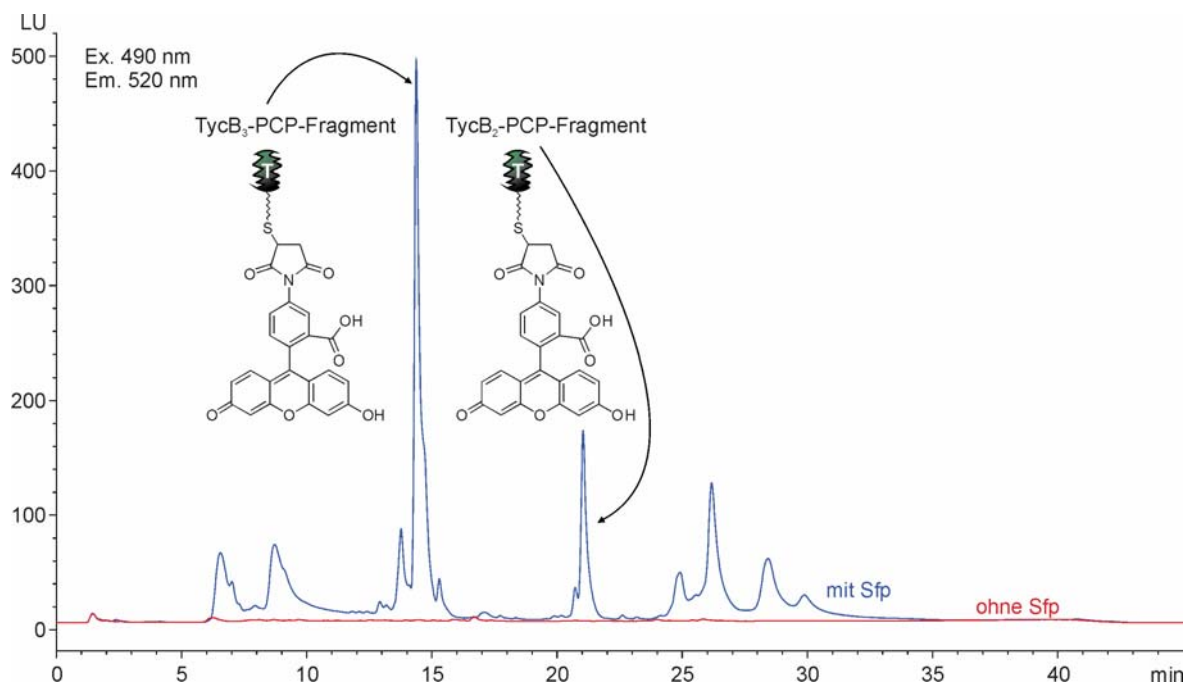
AT.CATE (Wildtypprotein) und TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> (E-Domänen-Austauschprotein) am jeweils zweiten PCP (TycB<sub>3</sub>-PCP) darzustellen. Die größte Herausforderung bestand in der Entwicklung und Optimierung einer Sequenz von enzymatischer Reaktion, tryptischem Verdau und Analytik der peptidischen Fragmente. Zunächst mussten geeignete Ppant enthaltende Peptide in dem komplexen Gemisch aller tryptischen Fragmente, die aus dem partiellen Verdau der Dimodule hervorgehen können, identifiziert werden. Zur Markierung der aktiven konservierten PCP-Serinreste wurde eine beschriebene chemoenzymatische Strategie [McLoughlin *et al.*, 2005] durch die Verwendung eines anderen Fluorophors modifiziert. Das jeweilige TycB<sub>2-3</sub>-Dimodul wurde unter Verwendung von Sfp (s. 4.4.1) und Fluorescein-CoA (zur Synthese s. 4.3.2.2) mit Fluorescein-S-Ppant an beiden PCPs beladen (Abbildung 5-10).



**Abbildung 5-10** Schematische Darstellung der chemoenzymatischen Strategie zur Markierung der aktiven Serinreste in den TycB<sub>2-3</sub>-Proteinen. Die Reaktion erfolgt durch Katalyse der Ppant-Transferase Sfp.

Überschüssiges CoA-Derivat wurde aus der Reaktionsmischung durch eine kurze Gel-filtration entfernt, worauf der tryptische Verdau vorgenommen wurde (s. 4.4.3.1). Nachdem die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Ameisensäure beendet worden war, wurden die Proben per HPLC mit einer C4-Säule und Fluoreszenzdetektion der aufgetrennten Fragmente analysiert (s. 4.5.2.3). Anhand des Erhalts von zwei dominanten Signalen bei einer Retentionszeit von 14–15 und 20–21 min (Abbildung 5-11) konnten ein Substrat zu Protease-Verhältnis von 5 : 1 (w/w) und eine Inkubationszeit von 5 min bei 30 °C in Assaypuffer als optimale Bedingungen für den tryptischen Verdau ermittelt werden. Die den beiden Signalen entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt, lyophilisiert und nach Resuspension in 10% MeOH (mit 1% Ameisensäure) per HPLC-ESI-FTICR-MS unter

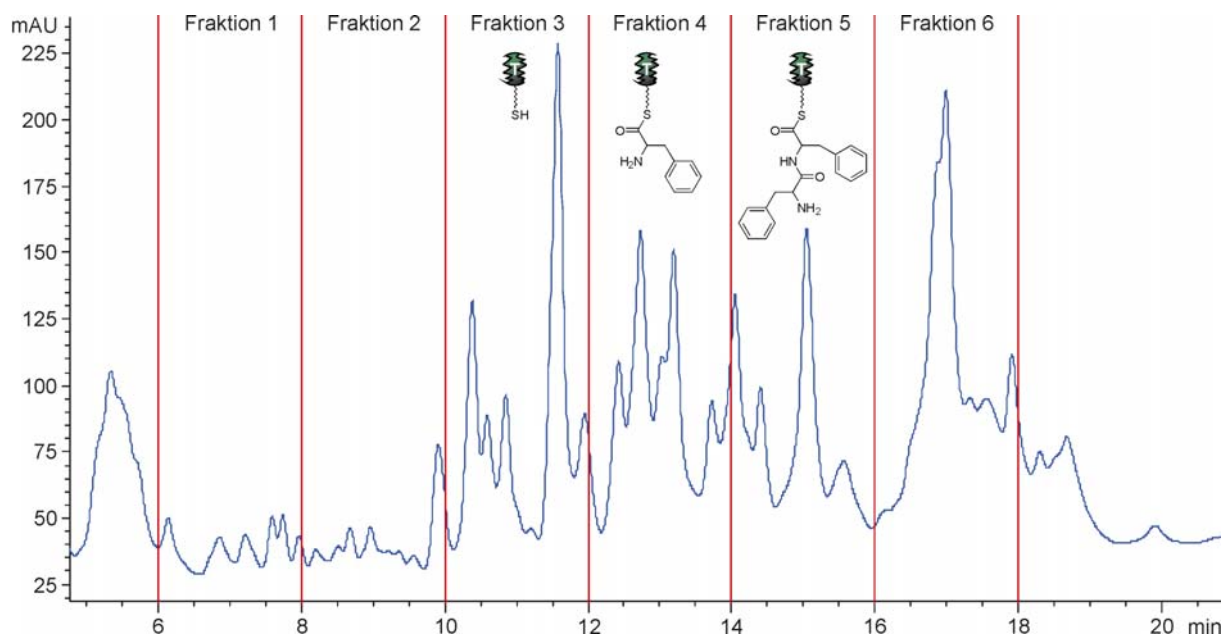
Verwendung einer C8-Säule zur weiteren Auftrennung analysiert (s. 4.5.2.4). Dabei konnten Spezies entdeckt werden, deren Massen mit den entsprechend theoretisch berechneten (s. 4.4.3.1), vollständig verdauten Fluorescein-S-Ppant-markierten PCP-Fragmenten in den Ladungszuständen  $2^+$  und  $3^+$  übereinstimmten. In der zum ersten (und auch intensivsten) Fluoreszenzsignal gehörenden Fraktion war das vollständig verdaute TycB<sub>3</sub>-PCP Fragment (Gln<sup>1579</sup>–Lys<sup>1595</sup>) mit aktivem Serin (Ser<sup>1593</sup>) enthalten (s. Tabelle 5-3).



**Abbildung 5-11** HPLC-Analyse nach Fluoreszenzmarkierung der aktiven Serinreste im dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Modellsystem. Das Protein war mit Fluorescein-CoA und Sfp beladen und mit Trypsin verdaut worden. Das abgebildete Chromatogramm zeigt die über eine C4-Säule aufgetrennten und durch Fluoreszenzdetektion visualisierten tryptischen Fragmente. Ohne die Zugabe von Sfp waren detektierbare Signale kaum vorhanden. Die Zuordnung der markierten, vollständig verdauten PCP-Fragmente geschah durch Sammeln der entsprechenden Fraktionen und anschließender HPLC-ESI-FTICR-MS-Analyse.

Nach erfolgter Eingrenzung des Elutionsbereichs, in dem die Fraktionen von Interesse zu sammeln waren, und Identifizierung des vorherrschenden tryptischen Fragments, gelang es schließlich, auch die entsprechenden TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente mit gebundenen Intermediaten nach natürlicher Substrataktivierung zu identifizieren. Dazu wurde TycB<sub>2-3</sub> durch fünfminütige Inkubation mit CoASH und Sfp in die aktive Holo-Form überführt (s. 4.4.1), bevor die Adenylierung und Beladung von in der Reaktionsmischung enthaltenem Phe durch die Zugabe von ATP initiiert wurde. Die enzymatischen Reaktionen wurden nach einer Dauer von 15 min direkt durch einen tryptischen Verdau (wie oben beschrieben) beendet. Das

Trypsin wurde durch die Zugabe von Ameisensäure deaktiviert und die Proben einer C4-HPLC Separierung unterzogen, wobei im Retentionsbereich zwischen 6 und 18 min Fraktionen von 1 ml gesammelt und im Anschluss lyophilisiert wurden. Danach wurden die Rückstände in 10% MeOH (mit 1% Ameisensäure) aufgenommen und per C8-HPLC-ESI-FTICR-MS analysiert. Hierbei konnten alle gewünschten entsprechend vollständig verdauten und am aktiven Serin modifizierten TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>–Lys<sup>1595</sup>)-Fragmente identifiziert werden: Holo- in der 10–12 min-Fraktion, Phe-S-Ppant- in der 12–14 min-Fraktion und Phe-Phe-S-Ppant- in den 12–14 und 14–16 min-Fraktionen (Abbildung 5-12).



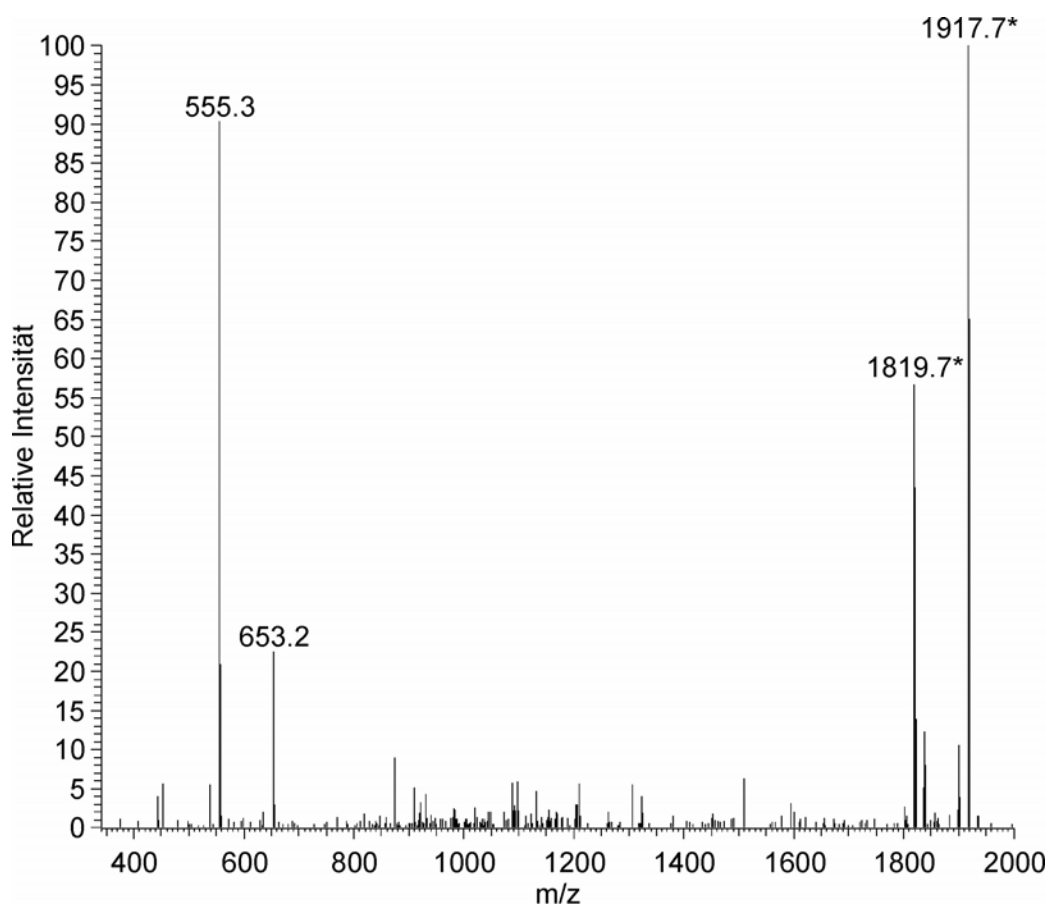
**Abbildung 5-12** Chromatogramm der C4-Trennung von tryptischen TycB<sub>2-3</sub>-Fragmenten nach natürlicher Substrataktivierung. Gezeigt ist das UV-Signal bei 215 nm und die zu jeder Probe gesammelten sechs Fraktionen von je 1 ml. Die Fraktionen 3–6 enthielten stets die gewünschten TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>–Lys<sup>1595</sup>)-Fragmente mit den gebundenen Reaktionsintermediaten. Entsprechend der Modifikation eluierten die Holo- (Fraktion 3), Phe-S-Ppant- (Fraktion 4) und Phe-Phe-S-Ppant- (Fraktion 5) Peptide nacheinander wie in der Abbildung gekennzeichnet.

Die Massen der detektierten Fragmente, die vorwiegend durch Spezies im zweifach geladenen Zustand beobachtet wurden, sind in Tabelle 5-3 aufgeführt.

**Tabelle 5-3** Identifizierung der tryptischen TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>–Lys<sup>1595</sup>)-Fragmente per ESI-FTICR-MS

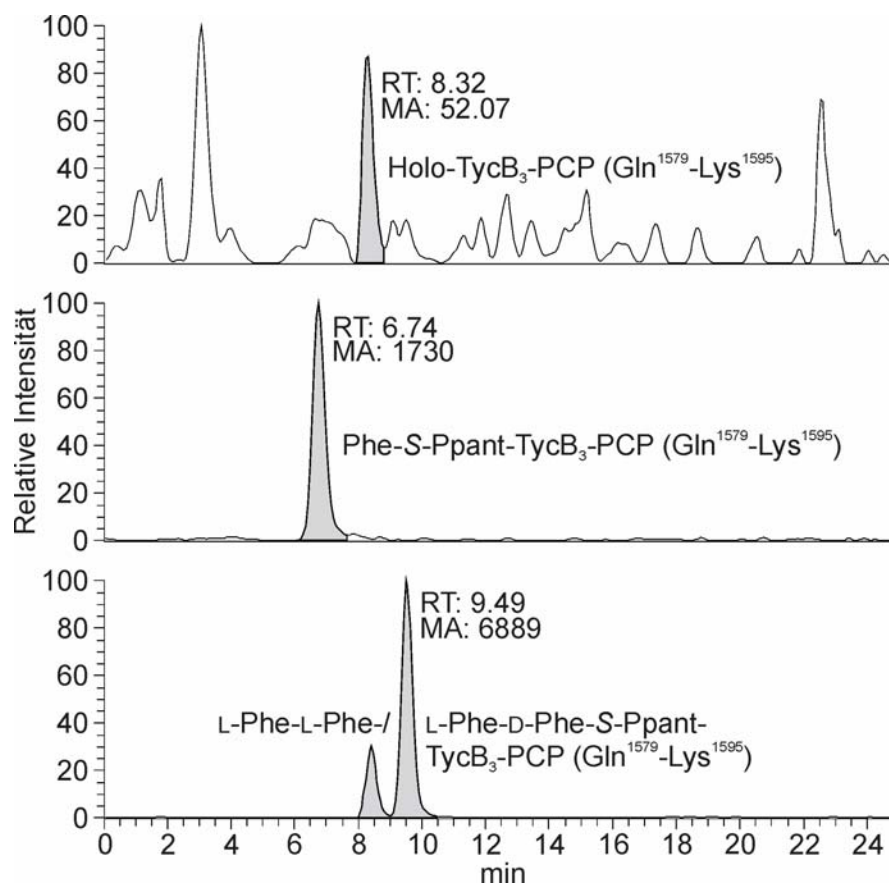
TycB <sub>3</sub> -PCP-Fragment	Spezies	Gemessene Masse [g mol <sup>-1</sup> ]	Berechnete Masse [g mol <sup>-1</sup> ]
Fluorescein-Ppant	[M + 3H] <sup>3+</sup>	874.6875	874.6860
Holo (H-S-Ppant)	[M + 2H] <sup>2+</sup>	1097.9953	1097.9905
Phe-S-Ppant	[M + 2H] <sup>2+</sup>	1171.5278	1171.5247
Phe-Phe-S-Ppant	[M + 2H] <sup>2+</sup>	1245.0639	1245.0589

Bei der Durchführung von MS<sup>2</sup>-Messungen zur Verifizierung der Identität der tryptischen Peptide, die für die Bestimmung der Dipeptid-Bildungsgeschwindigkeit der TycB<sub>2,3</sub>-Derivate nach natürlicher Substrataktivierung von Interesse waren, wurden in allen drei Fällen zwei dominante Fragmentensignale mit m/z-Werten von 1917.7 und 1819.7 beobachtet (Abbildung 5-13).



**Abbildung 5-13** MS<sup>2</sup>-Analyse der tryptischen TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente von Interesse. Das abgebildete Beispiel zeigt das Spektrum eines entsprechenden Phe-Phe-S-Ppant-Intermediats. Die zwei mit einem Stern markierten Signale (1819.7 und 1917.7) bilden das für den Ppant-Arm enthaltende Peptide charakteristische Fragmentierungsmuster.

Diese Signale entsprachen den oben genannten TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmenten, die das aktive Serin enthielten, jedoch den Pantethein-Arm in der Gasphase verloren hatten, wobei im ersten Fall die Phosphatgruppe am Peptid zurückblieb und im zweiten Fall mit abgespalten worden war. Unter Berücksichtigung dieses bevorzugten Fragmentierungsmechanismus wurde zur Quantifizierung der kovalent an das aktive Serin der TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente gebundenen S-Ppant-Intermediate das sogenannte *single reaction monitoring* (SRM) zur Extraktion der gewünschten Signale eingesetzt. Bei diesem Vorgehen, das eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität (Signal zu Hintergrund-Verhältnis) bewirkte, wurde das MS<sup>2</sup>-Signal bei 1917.7 als Produkt-Ion ausgewählt (vgl. Abschnitt 4.5.2.5). Die verbesserte Analytik erlaubte nicht nur eine sehr exakte Quantifizierung der unterschiedlichen Spezies, sondern ließ zugleich eine Aussage über die Aktivität der in den TycB<sub>2,3</sub>-Derivaten enthaltenen E-Domänen zu, da es möglich war, die extrahierten L-Phe-L-Phe- und L-Phe-D-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente voneinander zu trennen. In Abbildung 5-14 sind mit Hilfe der SRM-Methode erhaltene Chromatogramme gezeigt.



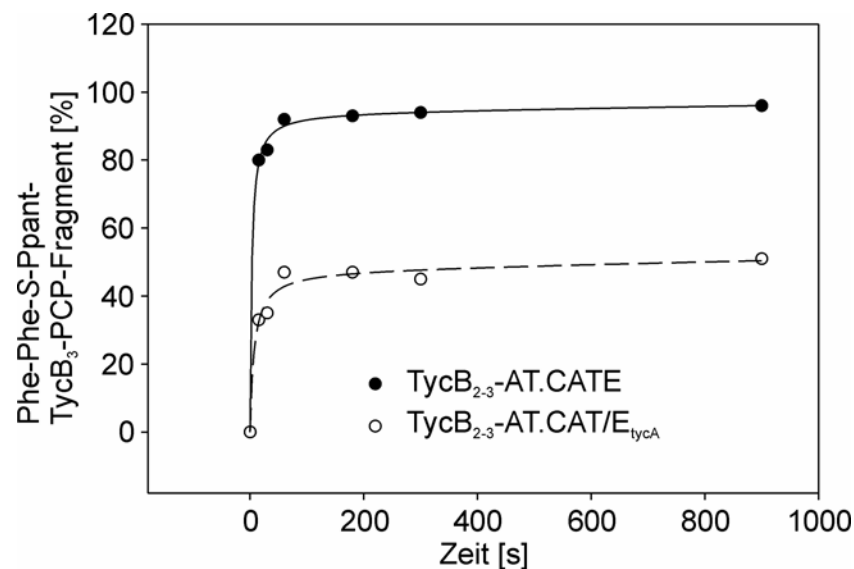
**Abbildung 5-14** Aus der SRM- (*single reaction monitoring*-) Methode resultierende Chromatogramme. Gezeigt sind die für die Quantifizierung extrahierten Signale (grau unterlegt) der entsprechend in der Graphik dargestellten TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente mit den gesuchten, gebundenen Reaktionsintermediaten [RT: Retentionszeit (*retention time*), MA: markierter Bereich (*marked area*)].

### 5.3.4 Direkte Bestimmung der Phe-Phe-S-Ppant-Bildungsaktivität

Die generelle Befähigung von Aminoacyl-E-Domänen, Peptidyl-S-Ppant-Substrate zu epimerisieren [Stein *et al.*, 2005], war im Rahmen dieser Arbeit durch Fehlbeladung der entsprechenden PCP-E-Domänen mit der Peptidyl-S-Ppant-Einheit von CoA-Vorläufern festgestellt worden. So konnte zwar eine erweiterte Substrattoleranz dieser E-Domänen bestätigt werden, jedoch blieb die Frage nach der Portabilität im Rahmen biokombinatorischer Ansätze mit Betracht auf die Funktionalität offen. Somit war die Untersuchung des Einflusses eines E-Domänen-Austauschs auf die enzymatischen Interaktionen in einem größeren – hier dimodularen Modellsystem – nach natürlicher Substrataktivierung von großem Interesse.

Um also die Auswirkungen einer Positionierung der TycA-E-Domäne in das Elongationsmodul TycB<sub>3</sub> auf die Dipeptid-Bildung durch das entsprechende TycB<sub>2-3</sub>-Hybrid-Protein zu evaluieren, mussten katalytische Konstanten ermittelt werden. Dies wurde erreicht, indem die Entwicklung des Phe-Phe-S-Ppant-Anteils gebunden an der PCP-Domäne des zweiten Moduls innerhalb des jeweiligen TycB<sub>2-3</sub>-Derivats direkt verfolgt wurde. Nach Erzeugung der Holo-Proteine und Initiierung der enzymatischen Phe-Aktivierung sowie Prozessierung, wie weiter oben beschrieben worden ist, wurden zu definierten Zeitpunkten (der früheste erfasste Zeitpunkt war 15 s) Proben entnommen und zum proteolytischen Verdau mit Trypsinlösung (Protease zu Substrat-Verhältnis wie oben angegeben) behandelt. Durch den Einsatz einer verhältnismäßig großen Menge an Trypsin konnte davon ausgegangen werden, dass die durch die Synthetasen katalysierten Reaktionen dabei sofort beendet wurden. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von Ameisensäure gestoppt, die Proben wurden per C4-HPLC getrennt, wie zuvor fraktioniert und die Fraktionen lyophilisiert. Die Rückstände der drei die Fragmente von Interesse enthaltenden Fraktionen wurden in 10% MeOH (mit 1% Ameisensäure) aufgenommen, die Lösungen vereint und durch die genannte optimierte C8-HPLC-ESI-FTICR-MS-Methode analysiert. Bei dieser Analytik – präziser als C8-HPLC-MS<sup>2</sup> oder –SRM-MS zu bezeichnen – wurde Tandem-Massenspektrometrie auf die den Ppant-Kofaktor enthaltenden Peptide angewendet, um die zuvor identifizierten holo-, Phe-S-Ppant- und Phe-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente aus dem Gesamtspektrum zu extrahieren. Durch Bestimmung des Integrals unter den entsprechenden Signalen (s. Abbildung 5-14) wurde die prozentuale Verteilung an gebundenem Dipeptid in zeitlicher Abhängigkeit verfolgt. Die auf diese Weise erhaltenen und in Abbildung 5-15 gezeigten Zeitkurven waren für die Berechnung von  $k_{\text{obs}}$ -Werten geeignet. Der Fehlerbereich, der aus drei unabhängigen Ermittlungen zu jedem Zeitpunkt abgeschätzt worden war, betrug dabei weniger als  $\pm 2\%$ . Das hier als Wildtypenzym bezeichnete Protein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE zeigte

eine außerordentlich schnelle Phe-Phe-S-Ppant-Bildung, die sich in einem  $k_{\text{obs}}$ -Wert von  $> 3.2 \text{ min}^{-1}$  äußerte. Die Reaktion endete in diesem Fall in 95% detektiertem Dipeptid (Phe-Phe) in am TycB<sub>3</sub>-PCP gebundener Form nach 15 min. Im Gegensatz dazu war die Dipeptid-Bildungsaktivität des E-Domänen-Austauschproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> merklich erniedrigt, wie sich anhand des ermittelten  $k_{\text{obs}}$ -Werts von  $1.3 \text{ min}^{-1}$  feststellen ließ. Hier betrug der nach 15 min Reaktionszeit detektierte Anteil an Phe-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragment nur 51%. Diese Ergebnisse deuteten bereits sehr klar auf einen Effekt der Aminoacyl-E-Domäne in einem Elongationsmodul auf die Peptid-Bildung durch die entsprechende Synthetase. In einem weiteren experimentellen Ansatz sollte dieser Einfluss mit größerer Aussagekraft im Zusammenhang der biokombinatorischen Umgestaltung von NRPS verifiziert werden.



**Abbildung 5-15** Kinetiken der Phe-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>-Lys<sup>1595</sup>)-Bildung. Die enzymatischen Reaktionen der in der Legende dargestellten TycB<sub>2-3</sub>-Derivate wurden durch die natürliche Aktivierung und Prozessierung von Phe mit der Zugabe von ATP initiiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden dann Proben entnommen, einem tryptischen Verdau unterzogen, über eine C4-HPLC fraktioniert und die entsprechenden, die Intermediat-Fragmente enthaltenden Fraktionen per HPLC-MS<sup>2</sup> analysiert. Der daraus berechnete Anteil an TycB<sub>3</sub>-PCP gebundenem Dipeptid (Phe-Phe) ist in zeitlicher Abhängigkeit dargestellt.

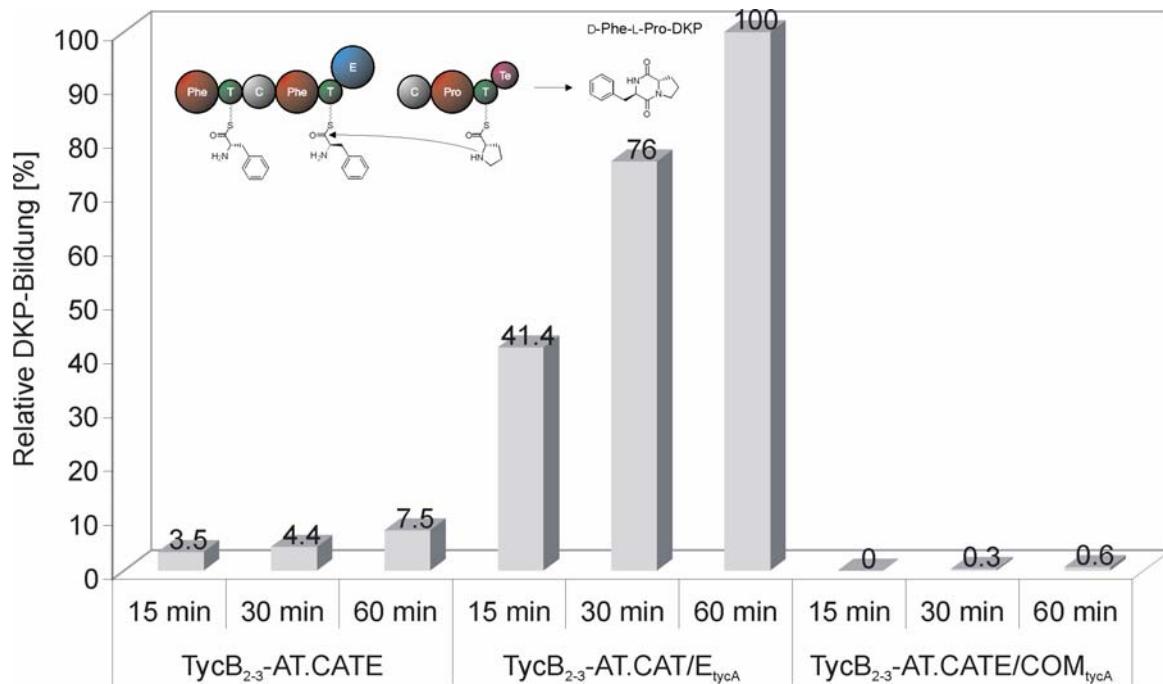
### 5.3.5 Produktbildung in Interaktion mit TycB<sub>1</sub>

Um einen Einfluss der Funktionalität von E-Domänen auf den geregelten Transfer von Reaktionsintermediaten zu untermauern, wurde erneut das gut etablierte Assay-System, das auf der Interaktion der Module TycA und TycB<sub>1</sub> beruht [Stachelhaus *et al.*, 1998], ausgenutzt. Die beiden Hybridproteine TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> und TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> können

als N-terminal erweiterte Module TycA angesehen werden und sollten prinzipiell mit dem Akzeptormodul TycB<sub>1</sub> kommunizieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die C-Domäne von TycB<sub>1</sub> bestimmte Peptidyl-Vorläufersubstrate – darunter auch Phe-Phe-S-Ppant – von TycA akzeptiert und prozessiert, wobei die Stereoselektivität der Donor-Bindungstasche unverändert bleibt [Stein *et al.*, 2005]. Austausch der COM-Domäne [Hahn & Stachelhaus, 2004; 2006] führte zum Erhalt von TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>TycA</sub>. In diesem Protein blieb die Peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> funktionell vollständig erhalten, wurde aber zur Erkennung von TycB<sub>1</sub> befähigt. Somit sollte über das gewählte Assay-System eine Evaluation der Verwendbarkeit von E-Domänen mit unterschiedlicher Herkunft im Kontext des Einsatzes von NRPS in biokombinatorischen Ansätzen generell möglich gemacht werden.

Das jeweilige TycB<sub>2-3</sub>-Derivat wurde zusammen mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>, das als Akzeptorprotein für eine schnelle Produktfreisetzung [Schwarzer *et al.*, 2001] ausgewählt worden war, inkubiert (s. 4.4.3.3). Enzymatische Aktivierung und Prozessierung der entsprechenden Substrat-Aminosäuren Phe und Pro, die beide in der Reaktionsmischung enthalten waren, wurden mit der Zugabe von ATP initiiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden dann Proben entnommen und die Reaktionen durch Präzipitation der Enzyme mit Methanol beendet. Nach Abtrennung des Überstandes wurde dieser aufgearbeitet und nach den Reaktionsprodukten per HPLC-MS (s. 4.5.2.2) analysiert. Dabei wurde deutlich, dass speziell im Fall des Austauschproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>TycA</sub> bei Interaktion mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> nicht nur das erwartete Tripeptid-Produkt sondern auch beachtliche Mengen an DKP (s. 2.4.1) aus der Reaktion hervorgingen. Also wurde bei der Analytik sowohl nach dem Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Pro (409.48 g mol<sup>-1</sup>) als auch nach dem verkürzten zyklischen Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP (244.29 g mol<sup>-1</sup>) [Stachelhaus *et al.*, 1998], das als Produkt einer Misinitiation am Modul TycB<sub>3</sub> der Modellproteine angenommen wurde, gesucht. Zur Quantifizierung wurden die Integrale unter den entsprechenden, aus dem Gesamtspektrum extrahierten [M + H]<sup>+</sup>-Massensignalen bestimmt und relative Bildungswerte berechnet, wobei die größte Menge an jeweils detektiertem Produkt (gebildet nach 60 min) als 100% definiert wurde. Der Fehlerbereich der Produktbildung wurde aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten abgeschätzt und betrug ± 5%. Die Ergebnisse der Produktbildungsassays sind in den Abbildungen 5-16 (DKP-Bildung) und 5-17 (FfP-Bildung) dargestellt. Es wurde jeweils nur ein Produktsignal detektiert, so dass vom Erhalt der angegebenen Stereochemie ausgegangen werden konnte.



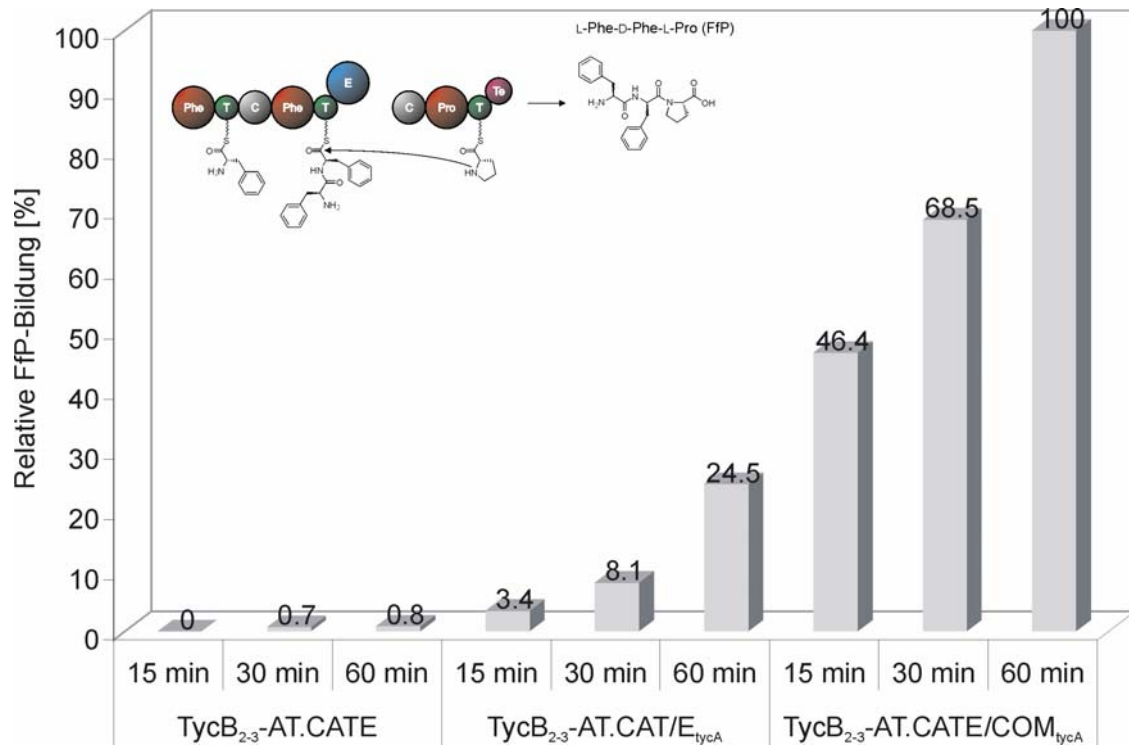


**Abbildung 5-16** Vergleich der relativen DKP-Bildungsaktivität mit dem Akzeptorenzym TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>. Die detektierte Menge an DKP (in Prozent) ist in zeitlicher Abhängigkeit unter Berücksichtigung des jeweiligen dimodularen Donorenzyms dargestellt.

Bei der Interaktion von TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> mit dem Akzeptor wurde eindeutig die größte Menge an DKP produziert, während bei Einsatz des Wildtypproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE, das eigentlich nicht mit TycB<sub>1</sub> interagieren sollte, ebenfalls eine geringe DKP-Bildung festgestellt werden konnte. Diese beruhte vermutlich auf zufälligen Begegnungen in der Lösung durch die verhältnismäßig hohe Enzymkonzentration, die für eine gute Produktdetektierbarkeit gewählt worden war. Nach Verwendung des Hybridproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> im Assay konnte bei der nachfolgenden Analyse praktisch keine DKP-Bildung festgestellt werden. Hingegen resultierte die Interaktion dieses Enzyms mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> in der höchsten Menge an detektiertem Tripeptidprodukt L-Phe-D-Phe-L-Pro. Im Vergleich dazu führte die Verwendung von TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> zu einer fast 14fach reduzierten FfP-Bildung nach einer Inkubationszeit von 15 min.

Es war sehr auffällig, dass bei der Transferreaktion zwischen dem E-Domänen-Austauschprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> und TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> zur oben angegebenen Inkubationszeit eine um mehr als 400fach bevorzugte Produktion von DKP im Vergleich zur Bildung des Tripeptids auftrat. Wie erwartet fungierte das Wildtypprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE in der Reaktion mehr oder weniger als Negativkontrolle, was sich darin zeigte, dass praktisch kein FfP-Tripeptid aus der entsprechenden Reaktion mit dem Akzeptor hervorging. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die Funktionalität einer E-

Domäne einen Einfluss auf die intramodularen enzymatischen Vorgänge *in cis* und somit auch auf die *in trans* ablaufende intermodulare Prozessierung von Intermediaten bei der nichtribosomalen Peptidsynthese ausüben kann.



**Abbildung 5-17** Vergleich der relativen Tripeptid- (FfP-) Bildungsaktivität mit dem Akzeptorenzym TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>Srf</sub>. Die detektierte Menge an FfP (in Prozent) ist in zeitlicher Abhängigkeit unter Berücksichtigung des jeweiligen dimodularen Donorenzyms dargestellt.

## 6 Diskussion

Ein ständiges Ziel der naturwissenschaftlichen Forschung, dem besonders viel Bedeutung zugeschrieben wird, ist die Erweiterung nützlicher Kenntnisse für das Design und die Produktion neuer, bioaktiver Wirkstoffe. Unter anderem stellt das rapide Wachstum der Anzahl multiresistenter Erregerstämme die Identifikation bislang unbekannter sowie die Variation wirksamer Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten in den Vordergrund dieses Forschungsgebiets. Biochemische Methoden bieten dabei alternative Wege, die der synthetischen Chemie als effiziente Ergänzung können. Die Entwicklung enzymkatalysierter Herstellungswege zu neuen Verbindungen ist von großem Interesse, da sie aus ökonomischer und ökologischer Sicht entscheidende Vorteile gegenüber dem konservativen, totalsynthetischen Vorgehen aufweisen. So erübrigt sich aufgrund der hohen Spezifität enzymatischer Reaktionen beispielsweise der unter Umständen große Aufwand einer Schutzgruppenchemie, während hohe Ausbeuten erzielt werden können und kein übermäßiger Einsatz von organischen Lösungsmitteln notwendig ist. Die kombinatorische Neugestaltung von Enzymtemplaten ist ein vielversprechender Ansatz für die Biosynthese veränderter antibiotischer Wirkstoffe. Aufgrund ihres modularen und multienzymatischen Aufbaus scheinen die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hierfür in besonderem Maße geeignet zu sein. Deshalb ist es unerlässlich, einen grundlegenden Einblick in die Eigenschaften der einzelnen Domänen für sich und ihre molekularen Interaktionen mit anderen katalytischen Zentren innerhalb der Synthetasen zu gewinnen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen leisten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der optional in NRPS vorhandenen Epimerisierungs- (E-) Domänen. Zum einen wurden mit Hilfe chemoenzymatischer Mittel neue Einblicke in die Substratspezifität erhalten, zum anderen konnten Erkenntnisse zur Funktionalität von E-Domänen in Bezug auf den geregelten enzymatischen Ablauf der Multienzyme gewonnen werden. In diesem Zusammenhang konnte eine modifizierte massenspektrometrische Methode etabliert werden, die eine alternative Strategie zur Charakterisierung enzymgebundener Reaktionsintermediate darstellt. Mit den durch die gewählten Vorgehensweisen erzielten Ergebnissen war es möglich, eine erweiterte Evaluation des Potentials von E-Domänen und ihres denkbaren Nutzens für biokombinatorische Ansätze mit NRPS – also dem Enzymdesign zur Synthese neuer bioaktiver Peptide – vorzunehmen.

## 6.1 E-Domänen in der nichtribosomalen Peptidsynthese

Die Anzahl bereits entdeckter und neu hinzukommender nichtribosomal synthetisierter Peptide ist ebenso beeindruckend wie die Vielfalt ihrer Strukturen und deren Bandbreite unterschiedlicher pharmakologischer Relevanz. Ein entscheidender Grund für die große Variation der Produkte sind die durch entsprechende Domänen in den NRPS hervorgerufenen, optionalen Modifikationen. Der Einbau von D-Aminosäuren wird dabei am häufigsten beobachtet und scheint eine erhebliche Rolle für die Bioaktivität der Peptide zu spielen. Zum einen sind Peptidbindungen, die eine D-Aminosäure enthalten, widerstandsfähiger gegen einen Abbau durch Proteasen [Marahiel *et al.*, 1997]. Zum anderen wird in vielen Fällen erst mit dem Vorhandensein von D-konfigurierten Aminosäuren eine für die Bioaktivität der Verbindungen essentielle Konformation eingenommen [Fernandez-Lopez *et al.*, 2001]. Bei der nichtribosomalen Peptidsynthese wird die Inversion von enzymgebundenen Bausteinen, die dann in das Produktgerüst eingebaut werden, am häufigsten durch modulintegrierte E-Domänen katalysiert [Stein *et al.*, 1995]. In Initiationsmodulen wird ein PCP gebundenes Aminoacyl-S-Ppant-Substrat epimerisiert [Stachelhaus & Walsh, 2000; Luo *et al.*, 2001], während in Elongationsmodulen der über einen Thioester gebundene C-terminale Aminosäurerest eines Peptidyl-S-Ppant-Substrats nach erfolgter *upstream* Kondensation invertiert wird [Linne & Marahiel, 2000; Luo *et al.*, 2002]. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Wirksamkeit von nichtribosomal synthetisierten Peptiden standen E-Domänen im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen, um ihren Nutzen für die Biokombinatorik zu evaluieren. Es konnte gezeigt werden, dass die E-Domänen aus den Phe aktivierenden Initiationsmodulen GrsA und TycA auch alternative Aminoacyl-Substrate akzeptieren [Belshaw *et al.*, 1999; Linne *et al.*, 2001]. Dabei zeigte TycA-E eine nur leicht erniedrigte Effizienz bei der Inversion von Trp, Ile und Val im Vergleich zur nativen Reaktion. Außerdem war bekannt, dass die E-Domäne aus dem ebenfalls Phe aktivierenden Elongationsmodul TycB<sub>3</sub> anstelle des kognaten Tetrapeptidyl-Substrats ein Phe-S-Ppant epimerisiert, jedoch mit merklich verminderter Aktivität [Linne & Marahiel, 2000]. Hingegen war über die Fähigkeit von Aminoacyl-E-Domänen zur Inversion von Peptidyl-Substraten nichts berichtet worden. Somit blieben noch entscheidende Fragen in Bezug auf die Substratspezifität und die Funktionalität offen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob tatsächlich Unterschiede zwischen Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domänen bestehen, oder ob ihre Rollen nur durch die individuelle Einbettung in andere enzymatische Umgebungen innerhalb einer Synthetase vorgegeben sind.

Die Biosynthese an bakteriellen NRPS-Systemen findet in vielen Fällen über mehrere einzelne Proteinstränge statt. Häufig sind am C-Terminus solcher Synthetasen E-Domänen vorzufinden, die für die spezifische Wechselwirkung der Proteine und somit für die gerichtete Peptidproduktion relevant sind [Linne et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Protein-Protein Erkennung durch die in E-Domänen enthaltenen COM-Domänen Sequenzen gesteuert wird [Hahn & Stachelhaus, 2004; 2006]. Dies macht C-terminale E-Domänen zu Schlüsselstellen bei der Herstellung hybrider NRPS, so dass sich die vorliegende Arbeit in einem weiteren Teil mit der Untersuchung ihrer Funktion im Kontext des intermodulareren Zusammenspiels für die gerichtete Peptidsynthese auseinander setzte.

## 6.2 Substratspezifität von E-Domänen

Das kognate Substrat von E-Domänen ist in ihrem nativen enzymatischen Verbund stets durch das Modul, dem sie angehören, vorgegeben. Die über einen Thioester am jeweiligen PCP eines Moduls gebundene Aminosäure wird durch die entsprechende A-Domäne selektiert und aktiviert, während für die Länge des Substrats die Stellung des Moduls innerhalb eines NRPS-Systems entscheidend ist. Nach den bisherigen Untersuchungen schienen E-Domänen eine relaxierte Substrattoleranz aufzuweisen, allerdings blieb wie oben angedeutet noch offen, in welchem Umfang ihre Spezifität mit der Vorhersage anhand der Spezifität der jeweiligen A-Domäne und der Position des entsprechenden Moduls im Multienzym übereinstimmt. Für die Lösung dieser Aufgaben wurde eine neue Strategie zur Variation der Substrate für E-Domänen gewählt.

### 6.2.1 Chemoenzymatische Modifikation von PCP-E-Domänen

Die Charakterisierung von E-Domänen kann theoretisch auf verschiedenen Wegen erfolgen, wobei jedoch bedacht werden muss, dass sie als natives Substrat ein PCP gebundenes Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Pant empfangen [Stein et al., 1995]. Zur schnellen Substratvariation sowie zur Erfassung von kinetischen Daten wären prinzipiell lösliche, freie Substrate am besten geeignet. Es wurden bereits chemisch synthetisierte Aminoacyl-Pantethein (-pant), die Mimikry des normalerweise am PCP präsentierten Ppant-Thioesters darstellen, als Substratanaloga *in trans* mit der GrsA-E-Domäne (in Form des Initiationsmoduls GrsA-ATE) getestet [Luo et al., 2001]. Die mit Hilfe dieser Substrate bestimmten  $K_m$ -Werte lagen jedoch im Bereich von 2–10 mM, was auf eine schwache Akzeptanz schließen lässt. Es wird deutlich, dass durch Verwendung von solchen

Substratmimiken keine Aussage über die Substratspezifität von E-Domänen in ihrem natürlichen enzymatischen Verbund getroffen werden kann. Gleichzeitig rückt die Bedeutung des mit der E-Domäne in Kontakt stehenden PCPs für eine effiziente Erkennung des Substrats in den Vordergrund. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass E-Domänen nur aktiv sind, wenn die Verbindung zu einem PCP<sup>E</sup> – die spezielle Bezeichnung für ein PCP, das natürlicherweise vor einer E-Domäne steht und mit ihr interagiert – erhalten bleibt [Linne *et al.*, 2001]. Alternative Strategien zur Variation der Substrate bieten sich in Bezug auf A-Domänen, die in der nichtribosomalen Produktassemblierung das Substrat für die E-Domänen innerhalb eines Moduls bestimmen. Die Spezifität der Bindungstaschen von A-Domänen ist durch den zehn Aminosäuren umfassenden „nichtribosomalen Code“ vorgegeben [Stachelhaus *et al.*, 1999]. Durch Mutationen dieses Codes lässt sich die Spezifität von A-Domänen gezielt verändern [Eppelmann *et al.*, 2002], was ausgenutzt werden könnte, um so A-PCP-E Module mit unterschiedlicher A-Domänenspezifität zu erzeugen. Andererseits sind die Grenzen zwischen den Modulen und Domänen von NRPS über Sequenzvergleiche detailliert charakterisiert worden [Dökel & Marahiel, 2000]. So wurden bereits Studien zur Spezifität von E-Domänen durch einen Austausch von A-Domänen zur Erzeugung von Fusionsproteinen des Typs A/PCP-E durchgeführt [Linne *et al.*, 2001]. Auch ist bekannt, dass ein PCP-E das Substrat von seiner kognaten A-Domäne *in trans* akzeptiert [Stachelhaus & Walsh, 2000]. So wäre es prinzipiell möglich das Substrat für PCP-E-Domänen durch die Verwendung verschiedener A-Domänen zu variieren, allerdings sind in diesem Zusammenhang keine Daten für die generelle Durchführbarkeit vorhanden. Alle genannten Möglichkeiten unter Einbeziehung von A-Domänen haben den prinzipiellen Nachteil, dass sie auf Grund eher genetischer Vorgehensweise sehr zeitaufwendig sind und auf diesen Wegen nur Aminoacyl-Substrate variiert werden können.

Die Fehlbeladung von PCP-Domänen mit dem Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Ppant-Anteil von entsprechend synthetisch hergestellten CoA-Derivaten unter Ausnutzung der Promiskuität der mit dem Surfactin-Operon assoziierten Ppant-Transferase Sfp wurde bereits erfolgreich zur Charakterisierung von C- [Belshaw *et al.*, 1999; Clugston *et al.*, 2003] und Te-Domänen [Sieber *et al.*, 2003] eingesetzt. Dieser chemoenzymatische Ansatz erschien auch für die Evaluation der nativen Substrattoleranz von E-Domänen als sinnvoll. Zu diesem Zweck waren PCP-E-Domänen als kleinste funktionelle Einheit [Stachelhaus & Walsh, 2000] besonders geeignet, da der für die Aktivität der E-Domäne erforderliche Kontakt zum entsprechenden PCP<sup>E</sup> erhalten bleibt. Zwar hätten prinzipiell auch ganze A-PCP-E Module durch Umgehung der A-Domänen-Reaktion mit CoAs beladen werden können, jedoch war

die Ausbeute bei der Überproduktion der rekombinanten Didomänen deutlich höher. Der dadurch ermöglichte Einsatz größerer Proteinmengen im Epimerisierungs-Assay in Kombination mit der Verwendung von Peptidyl-Substratvorläufern bot den Vorteil einer HPLC-basierten Analytik der Reaktionsprodukte im Gegensatz zu dem zuvor etablierten dünschichtchromatographischen Assay mit radioaktiv markierten Aminosäuren [Stachelhaus & Walsh, 2000; Linne & Marahiel, 2000; Linne *et al.*, 2001]. Durch die hohe Variabilität und parallele Durchführbarkeit bei der chemischen Synthese der CoA-Derivate und die alternative Analytik gewährleistete das chemoenzymatische Assaysystem generell einen höheren Durchsatz. Aus ersten zeitabhängigen Versuchen ging hervor, dass bei einer Verwendung von 15  $\mu$ M Sfp [Verhältnis zu den Didomänen etwa 1 : 4 bis 1 : 6 (Sfp/PCP-E)] für eine schnelle Modifikationsreaktion die Beladung der PCP-E-Didomänen bereits nach 15 s (frühester gemessener Zeitpunkt) fast vollständig abgelaufen war. Dadurch war gewährleistet, dass eine nur geringe zeitliche Überschneidung von Beladungs- und Epimerisierungsreaktion bestand, was einen systematischen Fehler bei den Untersuchungen minimierte. Die durch die E-Domänen katalysierte Einstellung des Peptidyl-L/D-S-Pant-Gleichgewichts wurde durch Beenden der enzymatischen Reaktionen über Proteinpräzipitation mit 10%iger TCA verfolgt. Dazu wurden die gebundenen, mit dem Protein pelletierten Reaktionsprodukte durch alkalische Hydrolyse des Thioesters freigesetzt, aufgearbeitet und per HPLC-MS analysiert. Die peptidischen Diastereomere konnten sehr gut mit einer C18 *reversed phase* Säule getrennt und über die extrahierten Massensignale quantifiziert werden, wobei die Verwendung eines internen Standards nicht erforderlich war. Hydrolysierte Peptidyl-CoAs dienten zur Verifizierung der Stereochemie der Produkte. Da die Epimerisierungsreaktionen so auch zeitlich aufgelöst werden konnten, war ein neues Minimalsystem zur schnellen kinetischen Charakterisierung der Substratspezifität von E-Domänen etabliert.

### 6.2.2 Auswahl der enzymatischen Systeme und Design der Substrate

Für die Untersuchung der Substratspezifität von E-Domänen wurden vier individuelle rekombinante PCP-E-Didomänen generiert. Zwei dieser Konstrukte entstammten Elongationsmodulen (TycB<sub>3</sub>- und FenD<sub>2</sub>-PCP-E), während die zwei anderen ihren Ursprung in Initiationsmodulen (TycA- und GrsA-PCP-E) hatten. Im Gegensatz zu den Modulen TycA, GrsA und TycB<sub>3</sub>, die alle Phe aktivieren und bei der Biosynthese von Gramicidin bzw. Tyrocidin in die zu synthetisierende Peptidkette inkorporieren, ist FenD<sub>2</sub> für den Einbau von Thr bei der Fengycin-Biosynthese zuständig. Bei der FenD<sub>2</sub>- war also eine zur TycB<sub>3</sub>-E-

Domäne entgegengesetzte Spezifität zu erwarten, was ein entscheidendes Auswahlkriterium darstellte.

Die synthetisierten Peptidyl-CoAs (s. Abbildung 5-4), deren Peptidyl-S-Ppant-Anteil nach dem durch Sfp katalysierten Transfer auf ein PCP das Substrat für die E-Domäne darstellte, wurden in erster Linie so gestaltet, dass sie für das System TycB<sub>3</sub>-PCP-E geeignet schienen. Ausgehend vom kognaten Substrat der TycB<sub>3</sub>-E-Domäne – dem Tetrapeptidyl-Substrat D-Phe-L-Pro-L-Phe-L-Phe-S-Ppant (fPFF-S-Ppant) – wurden CoA-Derivate dieses Substrats (fPFF-CoA, **1**) und von auf die beiden C-terminalen Aminosäuren beschränkten Peptiden hergestellt, wobei FF- (**2**) und Ff-CoA (**3**) diastereomere Dipeptidyl-Mimikry des nativen Substrats darstellten. In der Annahme, dass hauptsächlich der direkt Thioestergebundene Aminosäurerest des Substrats an einer Erkennung durch die E-Domäne beteiligt ist, wurde bei den CoAs diese Position (**R**<sub>2</sub>) variiert, während das N-terminale Phe (**R**<sub>1</sub>) konstant gehalten wurde. Bei CoA **14** hingegen wurde das C-terminale Phe (**R**<sub>2</sub>) beibehalten und der N-terminale Rest (**R**<sub>1</sub>) zu Ser verändert. Das kognate Substrat von FenD<sub>2</sub>-E ist ebenfalls ein Tetrapeptidyl-S-Ppant – L-Glu-D-Orn-L-Tyr-L-Thr-S-Ppant (EoYT-S-Ppant). Betrachtet man ausgehend vom Thioester nur die beiden ersten Aminosäuren, wird deutlich, dass sich an N-terminaler Position (**R**<sub>1</sub>) der Phe-analoge aromatische Rest Tyr befindet. Somit waren die Substrate auch für die Untersuchung der E-Domäne von FenD<sub>2</sub> geeignet. Über die Fähigkeit von Aminoacyl-E-Domänen (hier TycA- und GrsA-E) zur Epimerisierung von Peptidyl-Substraten war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Das Assaysystem und die synthetischen CoA-Substratvorläufer boten eine elegante und schnelle Gelegenheit, darüber mehr zu erfahren. Auch eigneten sich entsprechend synthetisierte Substrate zur Untersuchung der bislang fraglichen Kompatibilität von E-Domänen mit *N*-methylierten Substraten und das Assaysystem nach entsprechender Erweiterung zur Evaluation der Fähigkeit einer C-Domäne, die in ihrem nativen Umfeld ausschließlich Aminoacyl-S-Ppant-Substrate vom Donor-Modul empfängt, auch Peptidyl-Substrate zu elongieren.

### 6.2.3 Epimerisierungsaktivität mit variierenden Substraten

Die Aktivität einer E-Domäne mit einem bestimmten Substrat wurde nach initiiertem Beladung des entsprechenden PCP-E-Proteins durch die Zugabe von Sfp zum einen anhand der Anfangsgeschwindigkeit der Epimerisierungsreaktion und zum anderen anhand des nach 15 min erreichten L/D-Gleichgewichts zwischen den vom Enzym abgespaltenen Peptiden beurteilt. Da an der gesamten Reaktion also zwei Schritte – Beladung und Epimerisierung – beteiligt waren, wurde für die Anfangsgeschwindigkeit in Analogie zu früheren Unter-



suchungen [Stachelhaus & Walsh, 2000; Linne *et al.*, 2001] ein für die jeweilige Reaktion berechneter  $k_{\text{obs}}$ -Wert angegeben. Dies ist möglich, weil E-Domänen ein PCP-gebundenes Aminoacyl- bzw. Peptidyl-S-Ppant-Substrat von L nach D und umgekehrt von D nach L invertieren, bis ein Gleichgewicht zwischen beiden Stereoisomeren erreicht ist. Eine Freisetzung von Produkten findet an dieser Stelle somit, wie dies auch im nativen Vorgang der Epimerisierung durch E-Domänen bei der nichtribosomalen Peptidsynthese der Fall ist, nicht statt. Dennoch kann man bei der Inversion der enzymgebundenen Intermediate von einem *multiple turnover* sprechen.

#### 6.2.3.1 Selektivität der Peptidyl-E-Domänen

In Elongationsmodulen befindliche E-Domänen werden als Peptidyl-E-Domänen bezeichnet, da sie wie bereits erwähnt den über einen Thioester am PCP gebundenen Aminoacyl-Rest eines Peptidyl-S-Ppant-Substrats nach erfolgter *upstream* Kondensation invertieren [Linne & Marahiel, 2000; Luo *et al.*, 2002]. Über die Substrattoleranz solcher E-Domänen war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht viel bekannt. Es war wie oben (6.1) aufgeführt jedoch berichtet worden, dass die Peptidyl-E-Domäne des Moduls TycB<sub>3</sub> auch ein Aminoacyl- (Phe-) S-Ppant mit verminderter Effizienz epimerisieren kann [Linne & Marahiel, 2000]. Eine Fragestellung im Zusammenhang mit der Inversion elongierter Reaktionsintermediate war, wie tolerant die E-Domänen gegenüber einer Variation des C-terminalen Substratabschnitts sind und ob auch die anderen Reste des Peptidyl-Substrats für eine effiziente Erkennung durch die E-Domäne entscheidend sind. Im beschriebenen Epimerisierungsassay wurden die Peptidyl-E-Domänen von TycB<sub>3</sub> (Protein TycB<sub>3</sub>-PCP-E) und FenD<sub>2</sub> (Protein FenD<sub>2</sub>-PCP-E) untersucht. Wie durch die Verwendung von Dipeptidyl-CoAs im Assay schnell deutlich wurde, nehmen die beiden N-terminalen Aminosäuren des kognaten Tetrapeptidyl-Substrats von TycB<sub>3</sub>-E keine wichtige Funktion für die Erkennung durch die Epimerase ein. Wie erwartet äußerte TycB<sub>3</sub>-E eine generelle Präferenz gegenüber Peptidyl-S-Ppant-Substraten mit einem C-terminalen Phe oder Phe-analogen Rest. Allerdings zeigte sich bei Verwendung des CoA-Vorläufers **6** durch eine geringere Effizienz, dass Trp in Position **R**<sub>2</sub> nicht gleichermaßen toleriert bzw. möglicherweise sogar diskriminiert wird. Diese Beobachtung war überraschend, da zuvor berichtet worden war, dass die im Modul TycB<sub>3</sub> enthaltene A-Domäne die ebenfalls aromatische Aminosäure Trp effizient aktiviert (man findet D-Trp auch als vierte Aminosäure in den Tyrocidinen C und D vor) [Mootz & Marahiel, 1997a]. Daher hätte TycB<sub>3</sub>-E gemäß einer logischen Schlussfolgerung ein Peptidyl-S-Ppant-Substrat mit C-terminalem Trp ohne Aktivitätseinbußen invertieren müssen. Generell toleriert TycB<sub>3</sub>-E eine ganze Reihe von

Peptidyl-Substraten mit veränderten C-terminalen Aminosäureresten. Wie sich bei Verwendung der CoAs **7–13** im Epimerisierungsassay zeigte, liegt die Effizienz mit Ausnahme bei Einsatz von CoA **13** (FK-CoA) in vergleichbaren Größenordnungen.

Unter der Annahme, dass die Spezifität einer E-Domäne (bei Erkennung der C-terminalen Stelle des Substrats) mit der Spezifität des Moduls (der A-Domäne), der sie angehört, identisch ist, wurde im Verlauf dieser Arbeit entschieden, FenD<sub>2</sub>-E als erstes Beispiel für eine E-Domäne, die in der Natur nicht in einem Phe- sondern Thr-spezifischen Modul enthalten ist, zu untersuchen. Wie bereits zuvor erwähnt waren die synthetisierten CoA-Substratvorläufer auch für dieses Enzym-System geeignet. Interessanterweise, offenbarte FenD<sub>2</sub>-E keine generell verstärkte Aktivität mit Substraten, die an C-terminaler Position eine hydrophile Aminosäure aufwiesen. Ein Einbruch der Effizienz gegenüber Intermediaten nach Beladung mit den CoAs **1–5**, die mit Phe und Phe-Analoga an Position **R<sub>2</sub>** versehen waren, konnte praktisch nicht verzeichnet werden. Erstaunlich hingegen ist die etwas deutlicher reduzierte Reaktionskonstante ( $1.3 \text{ min}^{-1}$ ) bei der Epimerisierung der Dipeptidyl-Mimikry des kognaten Substrats nach Beladung mit FT-CoA (**10**), wobei auch nur 41% des D-Isomers (Ft) im Endgleichgewicht ermittelt werden konnten. Scheinbar existiert keine direkte Korrelation zwischen der Substratspezifität von E-Domänen und der Spezifität des Moduls, dem sie entstammen.

Obwohl die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptidyl-E-Domänen nicht nur ihren Ursprung in verschiedenen Biosynthesystemen haben, sondern zudem auch Modulen entgegengesetzter Substratspezifität entnommen wurden, weisen sie größere Übereinstimmungen in Bezug auf ihre Selektivität auf, als es zu erwarten gewesen wäre. Prinzipiell tolerieren beide E-Domänen eine ganze Reihe veränderter Substrate, und ihre Spezifitäten sind bei weitem weniger ausgeprägt als zuvor angenommen.

#### 6.2.3.2 Selektivität der Aminoacyl-E-Domänen

Bei der Untersuchung der ausgewählten Aminoacyl-E-Domänen war es hauptsächlich von Bedeutung, etwas über die Fähigkeit dieser E-Domänen zur Epimerisierung von Peptidyl-Substraten in Erfahrung zu bringen. In diesem Zusammenhang ist die Effizienz des hier präsentierten minimalen PCP-E-Domänen-Assaysystems und der Beladung mit synthetischen Peptidyl-CoA-Derivaten unter Verwendung von Sfp hervorzuheben. Eine alternative Strategie zur Gewinnung gleicher Informationen wäre die Herstellung von Fusionsproteinen zur natürlichen Substrataktivierung gewesen. Auf diese Weise wurde zuvor die Toleranz der TycA-E-Domäne gegenüber veränderten Aminoacyl-S-Ppant-Substraten

ermittelt [Linne *et al.*, 2001]. Allerdings wäre für diese Arbeit die aufwendige Konstruktion großer (mindestens dimodularer) und komplexer rekombinanter Proteinsysteme notwendig gewesen, was durch den chemoenzymatischen Ansatz umgangen werden konnte. Es wurde entschieden, die Substratspezifität der zwei Aminoacyl-E-Domänen aus den PheATE-Initiationsmodulen von TycA und GrsA näher zu untersuchen. Diese beiden Module – insbesondere GrsA [Luo *et al.*, 2001] waren in mehreren Studien intensiv charakterisiert worden. So war bereits bekannt, dass sie in vielen Eigenschaften Übereinstimmungen aufweisen, was unter anderem durch Verwendbarkeit und Ausnutzung beider Enzyme im sogenannten DKP-Assay [Stachelhaus *et al.*, 1998] deutlich gemacht worden war. Es wurde also vorausgesetzt, dass auch die beiden in den Modulen beinhalteten E-Domänen ein ähnliches Verhalten in ihrer Substrattoleranz zeigen würden.

Nachdem die entsprechenden Didomänen-Proteine TycA- und GrsA-PCP-E generiert worden waren, wurden sie im beschriebenen Epimerisierungsassay mit Peptidyl-Substraten eingesetzt. Die erste und auch wichtigste Entdeckung war, dass Aminoacyl-E-Domänen prinzipiell in der Lage sind, Peptidyl-S-Ppant-Substrate katalytisch zu invertieren. Dabei verhielten sich die beiden E-Domänen wie erwartet sehr ähnlich und epimerisierten die ausgewählten Substrate mit großer Effizienz. Unterschiede zu den getesteten Peptidyl-E-Domänen konnten wie unten erläutert zwar ausfindig gemacht werden, äußerten sich aber nicht so signifikant, wie es unter Umständen denkbar gewesen wäre. Zunächst wurden nach Beladung mit dem Tetrapeptidyl-S-Ppant von CoA **1** im Vergleich zu den Peptidyl-E-Domänen verminderte Reaktionsraten (TycA-PCP-E:  $1.0 \text{ min}^{-1}$  und GrsA-PCP-E:  $1.5 \text{ min}^{-1}$ ) festgestellt. Hier scheint die Länge des Substrats einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu nehmen, wobei das L/D-Endgleichgewicht jedoch nicht betroffen ist. Im Fall der Beladung von TycA-PCP-E mit Ff-CoA (**3**) und der anschließenden Inversion des Peptidyl-S-Ppant-Substrats von D nach L wurde im Gleichgewicht ein Anteil von 71% Ff vorgefunden, der bei entsprechend umgekehrter Epimerisierung (von L nach D) 54% betrug. Diese Auffälligkeit zeigte sich jedoch nicht bei dem gleichen Experiment mit GrsA-PCP-E. In diesem Zusammenhang war bereits bekannt, dass nach natürlicher Beladung von GrsA-ATE mit Phe die Epimerisierung von L nach D und umgekehrt gleich effizient abläuft und in ähnlichen Gleichgewichtspositionen endet [Stachelhaus & Walsh, 2000]. Bei Verwendung von FW-CoA (**6**) im Assay wurde offensichtlich, dass diese beiden E-Domänen aus Initiationsmodulen weniger tolerant gegenüber sterisch anspruchsvollen C-terminalen Aminosäuren im Substrat sind als die beiden E-Domänen mit Ursprung aus Elongationsmodulen (TycB<sub>3</sub> und FenD<sub>2</sub>). Allerdings scheinen die Aminoacyl-E-Domänen

Peptidyl-S-Ppant-Substratvariationen mit C-terminalen neutralen, hydrophilen Aminosäuren eher zu tolerieren, wie aus den schnellen katalytischen Inversionen ( $k_{\text{obs}}$  etwa  $2.0 \text{ min}^{-1}$ ) von FN- und FS-S-Ppant (nach Beladung mit den CoA-Derivaten **8** und **9**), die in hohen Gleichgewichtsmengen an entsprechenden D-Isomeren (63–68%) endeten, ersichtlich wurde. Dies ist ein weiterer auffallender Unterschied zu den Peptidyl-E-Domänen, jedoch kann die mechanistische Grundlage hierfür derzeit nicht erklärt werden, da weder Mutationsstudien einen eindeutigen Aufschluss über die Katalyse gaben [Stachelhaus & Walsh, 2000] noch die Kristallstruktur einer E-Domäne gelöst werden konnte. Ferner war auch bei den Aminoacyl-E-Domänen die Epimerisierungsgeschwindigkeit nach Beladung mit FK-CoA (**13**) ähnlich verlangsamt wie bei den Peptidyl-E-Domänen, aber im Gegensatz zu letzteren deutet das hier etwa um den Faktor zwei erhöhte Endgleichgewicht darauf hin, dass E-Domänen aus Initiationsmodulen etwas toleranter gegenüber geladenen Aminosäurefunktionen (hier Lys) für **R**<sub>2</sub> sind. Wahrscheinlich übt die positive Ladung der Aminogruppe in der Lys-Seitenkette generell einen destabilisierenden Effekt auf die Bildung des Epimerisierungsintermediats aus. Aminoacyl-E-Domänen sind möglicherweise aus Reaktivitätsgründen (s. 6.2.5) etwas widerstandsfähiger gegen eine derartige Beeinträchtigung.

#### 6.2.3.3 Toleranz von E-Domänen gegenüber *N*-methylierten Substraten

In der Vergangenheit beschäftigten sich bereits Studien mit dem Ergründen von Möglichkeiten, ob und wie in der kombinatorischen Biosynthese mit NRPS die Epimerisierung mit einer vorausgehenden *N*-Methylierung realisiert werden kann [Schauwecker *et al.*, 2000], da eine entsprechende Domänenorganisation bis heute noch in keinem natürlichen System vorgefunden werden konnte. Dazu wurden entsprechende Fusionsproteine mit Ursprung in den Actinomycin-Synthetasen hergestellt und biochemisch charakterisiert. Jedoch konnte dabei keine Aktivität der E-Domänen mit *N*-methylierten Vorläufern festgestellt werden, was vermutlich aus einer unvorteilhaften Fusionsstrategie (Verbindung einer E-Domäne mit einem PCP<sup>C</sup>) resultierte, wie bereits in einer späteren Publikation spekuliert worden war [Linne *et al.*, 2001]. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte chemoenzymatische Assaysystem machte es möglich, die ausgewählten E-Domänen auch auf ihre Toleranz gegenüber und Kompatibilität mit *N*-methylierten Peptidyl-S-Ppant-Intermediaten zu testen. Hierbei musste für die Beladung der PCP-E-Domänen das Tripeptidyl-CoA **17** (FFMeF-CoA) verwendet werden, da die entsprechenden Dipeptidyl-Vorläufer **15** (FP-CoA) und **16** (FMeF-CoA) sehr schnell, direkt nach der Modifikation unkatalysiert als entsprechende Diketopiperazine (DKP) von den Enzymen abgelöst worden

waren. Diese Reaktion *N*-methylierter Dipeptide ist nicht ungewöhnlich [Schwarzer *et al.*, 2001] und wurde auch dann beobachtet, wenn die entsprechenden CoAs zur Kontrolle in basischer Lösung hydrolysiert worden waren. Eine weitere Besonderheit war die Verwendung einer chiralen Säule zur HPLC-MS-Analyse der *N*-methylierten Reaktionsprodukte, da diese sich nicht über eine gängige C18-Säule auftrennen ließen.

Die vier getesteten E-Domänen (Peptidyl- wie Aminoacyl-) zeigten alle eine vergleichbare und sehr hohe Aktivität mit dem *N*-methylierten Vorläufer. Ein Peptidyl-S-Ppant-Substrat mit einer *N*-methylierten Peptidbindung, die direkt auf den C-terminalen Aminosäurerest folgt, scheint demnach die katalytische Inversion durch Epimerasen aus NRPS sogar zu unterstützen. Elektronische Veränderungen oder eine veränderte Konformation (erhöhte Planarität [Schwarzer *et al.*, 2001]), die durch die *N*-Methylierung induziert werden, könnten das enzymgebundene Enolat-Intermediat des Substrats während der katalytischen Epimerisierung durch E-Domänen stabilisieren und die Reaktion auf diese Weise vorantreiben. Die Kombinierbarkeit von M- und E-Domänen in einem (hybriden) Modul bleibt nach wie vor zu klären.

#### 6.2.4 Erkennung und Einfluss der Substrate

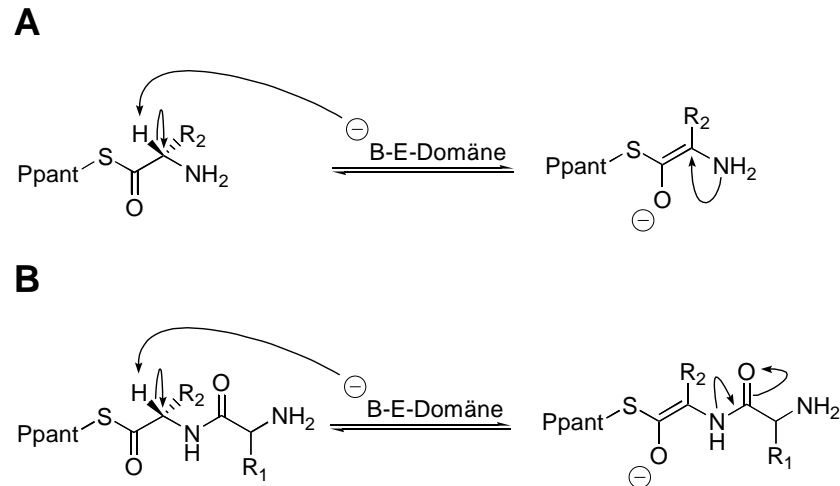
Die mit Hilfe des chemoenzymatischen Verfahrens gewonnenen Ergebnisse offenbarten mehr Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Substratspezifität zwischen E-Domänen unterschiedlicher Abstammung, als zu Beginn dieser Arbeit noch erwartet worden war. Mit wenigen Ausnahmen gab es keine Aktivitätsabweichungen in Größenordnungsbereichen. So zeigte die zu einem Thr-aktivierenden Modul gehörende FenD<sub>2</sub>-E-Domäne vergleichbare Aktivitäten mit Dipeptidyl-Substraten, die C-terminale aromatische Aminosäuren enthielten, wie die zu einem Phe-aktivierenden Modul gehörende TycB<sub>3</sub>-E-Domäne. Einen Hinweis auf die Erkennung der beiden Reste (**R**<sub>1</sub> und **R**<sub>2</sub>) im Substrat lieferte die um die Hälfte verminderte Epimerisierungsgeschwindigkeit von FenD<sub>2</sub>-PCP-E nach Beladung mit SF-CoA (**14**) im Vergleich zur entsprechenden Inversion von FS-CoA (Beladung von CoA **9**), da in erstem Fall beide Reste nicht kognat sind, im zweiten Fall jedoch analog zum nativen Substrat. Alle vier getesteten E-Domänen (Peptidyl- wie Aminoacyl-) waren vermindert aktiv bei der Inversion von FW-S-Ppant (Beladung mit CoA **6**), wobei im Fall der Aminoacyl-E-Domänen sogar der Anteil an produziertem D-Isomer im Gleichgewicht um 10–20% niedriger liegt. Unabhängig von der Substratspezifität des nativen Moduls (TycB<sub>3</sub> aktiviert auch Trp [Mootz & Marahiel, 1997a]) scheint eine C-terminale, sterisch anspruchsvolle Aminosäure im Substrat die Aktivität von E-Domänen negativ zu beeinflussen. Unklar ist jedoch, ob wirklich

eine Erkennung des Substrats durch die E-Domänen stattfindet, oder ob elektronische Veränderungen für die veränderten Aktivitäten verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass Veränderungen der N-terminalen Aminosäure (**R<sub>1</sub>**) ähnliche Effekte hervorrufen können wie Änderungen des C-terminalen Substratendes (**R<sub>2</sub>**). So zeigte TycB<sub>3</sub>-E mit FS- und SF-S-Ppant (Beladung mit CoA **9** bzw. **14**) eine gleich verminderte Aktivität und die Aminoacyl-E-Domänen (TycA- und GrsA-E) mit denselben Substraten eine ähnlich erhöhte Effizienz. Dass elektronische Einflüsse der Substrate maßgeblich die festgestellten Aktivitäten verändern, unterstreichen auch die mit dem *N*-methylierten Substrat FFM<sub>2</sub>F-S-Ppant (Voläufer CoA **17**) ermittelten (vergleiche 6.2.3.3), sehr effizienten Inversionen durch alle vier E-Domänen.

### 6.2.5 Aktivitätsvergleich Aminoacyl- versus Peptidyl-E-Domänen

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Substratspezifität von E-Domänen kann man zu dem Schluss kommen, dass in diesem Kontext kein auffälliger Unterschied zwischen Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domänen besteht. Beim Vergleich mit vorangegangenen Studien [Linne *et al.*, 2001] fällt dennoch auf, dass Aminoacyl-E-Domänen offenbar sowohl Aminoacyl- als auch Peptidyl-S-Ppant-Substrate effizient invertieren können, während Peptidyl-E-Domänen mit Peptidyl-S-Ppant-Substraten aktiver zu sein scheinen. Von der TycB<sub>3</sub>-E-Domäne wurde eine erniedrigte Epimerisierungsgeschwindigkeit ( $k_{\text{obs}}$ : 0.8 min<sup>-1</sup>) mit einem Phe-S-Ppant berichtet, wobei auch nur 40% D-Phe im Endgleichgewicht vorgefunden wurden [Linne & Marahiel, 2000]. Im Unterschied dazu wurde hier eine etwa um den Faktor 2.5 höhere Effizienz mit dem Peptidyl-Substrat Phe-Phe-S-Ppant ermittelt. Diese Beobachtungen stützen ein aufgestelltes Modell, dass die Epimerisierung eines Peptidyl-S-Ppant-Substrats aus elektronischen Gründen prinzipiell leichter ablaufen kann als die eines Aminoacyl-S-Ppant-Intermediats [Linne & Marahiel, 2000]. Das freie Elektronenpaar der Aminogruppe eines Aminoacyl-S-Ppants kann einen destabilisierenden Effekt auf das bei der katalytischen Inversion als Zwischenstufe auftretenden Enolat-Intermediats haben. Dieser ungünstige Einfluss ist bei der Epimerisierung eines Peptidyl-S-Ppants weniger stark, da das freie Amid-Elektronenpaar durch die Bildung mesomerer Peptidbindungsstrukturen abgezogen werden kann (Abbildung 6-1). Dem Modell zufolge scheinen Aminoacyl-E-Domänen von Natur aus für die eher herausfordernde Epimerisierung eines Aminoacyl-S-Ppant-Substrats optimiert zu sein. Somit könnte erklärt werden, weshalb sie in der Lage sind, sowohl Aminoacyl- als auch Peptidyl-S-Ppant-Substrate mit fast unveränderter Aktivität zu invertieren. Peptidyl-E-Domänen hingegen sind dementsprechend

scheinbar auch nur bei der katalytischen Epimerisierung von Peptidyl-S-Ppant-Substraten hoch effizient und können die anspruchsvolleren Aminoacyl-S-Ppant-Substrate schlechter umwandeln.



**Abbildung 6-1** Modell zur Gegenüberstellung von Aminoacyl- und Peptidyl-S-Ppant Epimerisierung. Verglichen wird die Stabilität der nach  $C_{\alpha}$ -Deprotonierung gebildeten Enolat-Intermediate. (A) Das freie Elektronenpaar der Aminogruppe eines Aminoacyl-S-Ppants übt einen destabilisierenden Effekt auf die Zwischenstufe aus. (B) Das freie Elektronenpaar der Amid-Gruppe eines Peptidyl-S-Ppants hingegen kann durch die Bildung mesomerer Grenzformen der Peptid-Bindung abgezogen werden, so dass die Bildung des Reaktionsintermediats hier weniger stark unterdrückt wird.

### 6.3 Substratspezifität der TycB<sub>1</sub>-C-Domäne

Nachdem die Fähigkeit von Aminoacyl-E-Domänen zur Epimerisierung von Peptidyl-S-Ppant-Substraten bestätigt worden war, kam konsequenterweise die Frage auf, ob C-Domänen, die in ihrem nativen enzymatischen Umfeld auf ein Initiationsmodul folgen, ebenfalls elongierte Substrate akzeptieren und prozessieren können. In diesem Zusammenhang ist die Toleranz der Donor-Bindungstasche einer C-Domäne von entscheidender Bedeutung. Es konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass diese Erkennungsstelle von C-Domänen im Gegensatz zur hochspezifischen Akzeptor-Bindungstasche eine größere Toleranz gegenüber verschiedenen Substraten aufweist [Belshaw *et al.*, 1999]. Dennoch besteht bei der Substraterkennung durch die Donor-Tasche im Fall von C-Domänen, die die Kondensation nach einer erfolgten Epimerisierung vornehmen, eine sehr hohe Stereoselektivität, so dass äußerst bevorzugt das vom *upstream* Modul bereitgestellte D-Isomer übernommen wird. Daher spricht man bei auf E-Domänen folgenden C-Domänen von  $^D C_L$ -Katalysatoren [Clugston *et al.*, 2003]. Es war bekannt, dass die TycC<sub>1</sub>-C-Domäne, die in

ihrem nativen Umfeld ein Tetrapeptidyl-Substrat von TycB<sub>3</sub> übernimmt, auch Aminoacyl-Vorläufer prozessieren kann [Linne & Marahiel, 2000; Linne *et al.*, 2003]. Obwohl die C-Domäne von TycB<sub>1</sub>, die normalerweise ausschließlich ein D-Phe von TycA akzeptiert, auch alternative Aminoacyl-Substrate prozessieren kann [Belshaw *et al.*, 1999; Linne *et al.*, 2003], war ihre Toleranz gegenüber Peptidyl-Substraten unerforscht.

Um eine solche Fähigkeit zu untersuchen, wurde die bekannte Interaktion zwischen TycA mit TycB<sub>1</sub> [Stachelhaus *et al.*, 1998] in einem *single turnover* Übertragungs- und Produktbildungsassay ausgenutzt. Nach der Beladung von TycA-PCP-E mit verschiedenen Peptidyl-CoAs wurde schnell beobachtet, dass TycB<sub>1</sub>-C diese Substrate akzeptiert und (um ein Pro) elongieren kann. Für eine schnelle Produktfreisetzung wurde hierbei das Akzeptorenzym TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> [Schwarzer *et al.*, 2001] ausgewählt und mit Pro vorbeladen. In den meisten Fällen wurde die Bildung eines enantiomerenreinen Produkts festgestellt (bei Verwendung der CoAs **1–3** und **7**). Die Stereoselektivität der TycB<sub>1</sub>-C-Donor-Bindungstasche bleibt folglich unabhängig von der Länge der eintreffenden Substrate erhalten. Dennoch wurde auf eine Diskriminierung von C-terminal im Substrat enthaltenen, nicht kognaten hydrophilen Aminosäuren geschlossen, da bei Einsatz von FT- und FK-CoA (**10** und **13**) im Assay keine elongierten Produkte detektiert werden konnten. Nach Beladung von TycA-PCP-E mit FS-CoA (**9**) und Kondensation mit Pro durch TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> wurde ein 1 : 1-Gemisch gebildeter Tripeptide (vermutlich L-Phe-L/D-Ser-L-Pro) gefunden. Gleiches wurde zuvor von der C-Domäne in TycC<sub>1</sub> berichtet. Dabei wurde ebenfalls ein Produktgemisch gefunden, wenn ein nicht kognates Aminoacyl-Substrat anstelle des kognaten Tetrapeptidyl-S-Ppant zur Kondensation angenommen wurde [Linne & Marahiel, 2000]. Auch hier scheint der zweite Aminosäurerest des Peptidyl-Substrats einen geringen Einfluss auf die Enzymaktivität – entweder elektronischer Art oder auf die Erkennung durch die C-Domäne – auszuüben, was durch ein vorgefundenes 5.4 : 1-Gemisch (vermutlich L-Ser-L/D-Phe-L-Pro) aus Tripeptidyl-Produkten nach der Elongation von Sf-/SF-S-Ppant (Beladung von TycA-PCP-E mit CoA **14**) angedeutet wird. Prinzipiell deckt sich also die Substrattoleranz der TycB<sub>1</sub>-C-Domäne mit der vorausgehenden TycA-E-Domäne.

## 6.4 Funktionalität von E-Domänen

Nach intensiven Studien der Substrattoleranz von E-Domänen stand fest, dass Peptidyl-E-Domänen auch Aminoacyl-Substrate [Linne & Marahiel, 2000] und umgekehrt Aminoacyl-E-Domänen auch Peptidyl-Substrate [Stein *et al.*, 2005] akzeptieren und epimerisieren können.



Somit kann auf Ebene der Spezifität keine eindeutige Unterscheidung zwischen E-Domänen aus Initiations- und Elongationsmodulen getroffen werden. Eine aufkommende Frage war also, ob die Bezeichnungen Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domäne – abgesehen von dem damit verbundenen Verweis auf ihre enzymatischen Abstammungen – noch berechtigt sind. Die Rekombinierbarkeit von E-Domänen war scheinbar nur noch durch die Notwendigkeit, mit einem PCP<sup>E</sup> in Verbindung stehen zu müssen, eingeschränkt. Die Kontrolle über den geregelten Transfer von epimerisierten Intermediaten wurde bislang im Wesentlichen der stereoselektiven Donor-Bindungstasche der stromabwärts befindlichen C-Domäne (<sup>p</sup>C<sub>L</sub>-Katalysator) zugeschrieben [Belshaw *et al.*, 1999; Clugston *et al.*, 2003]. Dennoch konnte ein Unterschied zwischen beiden Typen von E-Domänen auf funktioneller Ebene nicht ausgeschlossen werden, denn es gab Hinweise darauf, dass Aminoacyl-E-Domänen prinzipiell reaktiver sind als Peptidyl-E-Domänen [Stein *et al.*, 2005] (s. auch 6.2.5). Außerdem war bekannt, dass Peptidyl-E-Domänen eine entscheidende Rolle für die zeitliche Abfolge von Kondensation und Epimerisierung in Elongationsmodulen spielen [Linne & Marahiel, 2000]. Die bisherigen Ergebnisse deuteten zwar an, dass es zum Beispiel möglich sein müsste, das Initiationsmodul einer NRPS N-terminal zu verlängern, um so Hybride zur Erzeugung neuer (verlängerter) Produkte zu gestalten. Sowohl die Aminoacyl-E-Domäne als auch die nachfolgende C-Domäne sollten Peptidyl-Substrate normal prozessieren. Es galt jedoch zu überprüfen, ob eine Aminoacyl- wirklich die Position einer Peptidyl-E-Domäne übernehmen kann, ohne einen Einfluss auf die Domänen- und Modulinteraktionen innerhalb und zwischen komplex aufgebauten Synthetasen auszuüben.

#### 6.4.1 Das dimodulare Modellsystem

Eine Untersuchung der Funktionalität von E-Domänen in einem Elongationsmodul konnte nur mit Hilfe größerer Enzyme vorgenommen werden. Die durch Entfernung der N-terminalen C-Domäne zur Initiation befähigte dimodulare rekombinante Synthetase TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE (Wildtypprotein) [Linne & Marahiel, 2000] schien als Ausgangspunkt für die Gestaltung weiterer Proteine ideal zu sein (Phe spezifisch wie TycA). Arbeiten auf DNA-Ebene zur Modifikation des Systems konnten noch ohne größeren Aufwand gehandhabt werden, und die Vorgänge auf enzymatischer Ebene blieben überschaubar. Zur Evaluation von Auswirkungen nach Austausch der nativen Peptidyl- (TycB<sub>3</sub>-E) gegen eine Aminoacyl-E-Domäne (TycA-E) wurde das E-Domänen-Austauschprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> [Linne, 2001] untersucht. Im Fall dieser beiden Enzyme sollte der Einfluss der E-Domäne auf die Dipeptid- (Phe-Phe-) Bildung bestimmt werden. Dies geschah durch eine direkte Befragung am zweiten PCP der

jeweiligen Synthetase gebildeter Intermediate durch eine Abfolge von tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analytik. Um mögliche Veränderungen der Domäneninteraktionen innerhalb der dimodularen Proteine auch im Kontext der Kommunikation mit nachfolgenden Modulen zu testen, wurde ein weiteres Mal die Interaktion von TycA mit TycB<sub>1</sub> [Stachelhaus *et al.*, 1998] in einem Produktbildungsassay ausgenutzt. Das Protein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> war für diesen Zweck direkt einsetzbar. Ein Protein, das die unveränderte Peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> enthält, aber ebenfalls mit TycB<sub>1</sub> kommunizieren kann, musste hingegen zusätzlich konstruiert werden. Die berichtete Entdeckung kurzer Aminosäuresequenzen an den C-Termini von Donor-Synthetasen und den N-Termini von Akzeptor-Synthetasen, die als COM-Domänen bezeichnet werden [Hahn & Stachelhaus, 2004; 2006] und für die *in trans* Interaktion von NRPS eine sehr wichtige Rolle einnehmen, war hier von großem Vorteil. Durch Austausch der COM-Domäne des Wildtypproteins gegen die entsprechende Sequenz von TycA wurde das Protein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> konstruiert. Somit wurde die Erhaltung der Peptidyl-E-Domäne bei Befähigung des Dimoduls zur Interaktion mit TycB<sub>1</sub> und ein funktioneller Vergleich der E-Domänen im Kontext einer Protein-Protein Wechselwirkung *in trans* prinzipiell realisiert.

#### 6.4.2 Massenspektrometrische Bestimmung der Dipeptidbildungsaktivität

Eine besonders sensitive und moderne Methode zur direkten Untersuchung enzymgebundener Reaktionsintermediate der nichtribosomalen Peptidsynthese (und Polyketidsynthese) besteht in einem (partiellen) proteolytischen Verdau zuvor inkubierter Enzyme, gefolgt von einer massenspektrometrischen Analyse entsprechender *carrier*-Protein Fragmente [Hicks *et al.*, 2004]. Um die Identifikation von interessierenden Fragmenten aus einem unter Umständen sehr komplexen Gemisch überhaupt zu ermöglichen, werden die entstandenen Peptide zunächst chromatographisch aufgetrennt und fraktioniert. Nach Trocknung und Resuspension der Proben in einem geeigneten Puffer, kann dann die hochsensitive Massenanalytik (über Fourier-Transform-MS) erfolgen. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden bereits die Funktionen neuartiger Domänen aufgeklärt [Aron *et al.*, 2005] oder die Vorgänge an Synthetasen filmartig verfolgt, wobei generell auch eine kinetische Auflösung möglich ist [McLoughlin & Kelleher, 2004]. Dieses Vorgehen schien nicht nur geeignet, sondern auch notwendig für die Untersuchung der Dipeptidbildung durch die dimodularen TycB<sub>2-3</sub> Modellsysteme dieser Arbeit. Bei einer Analyse der Produkte nach chemischer Thioesterspaltung würden auch die Phe-Intermediate am ersten PCP der Enzyme freigesetzt werden, wodurch eine Bestimmung der Phe-Phe-Bildung am jeweils zweiten PCP unmöglich wäre. Mit der hier ausgewählten

Methode ist es jedoch prinzipiell möglich sich nur auf gebundene Intermediate eines PCPs von mehrmodularen Synthetasen zu konzentrieren.

Die Eingrenzung von chromatographischen Fraktionen und Identifikation der hier interessanten proteolytischen TycB<sub>3</sub>-PCP Fragmente, die das aktive Serin für die Bindung von S-Ppant-Intermediaten enthielten, gelang durch eine modifizierte Fluoreszenzmarkierung [McLoughlin *et al.*, 2005] über die Sfp-katalysierte Beladung der Enzyme mit synthetisiertem Fluorescein-CoA. Ein Verdau mit Trypsin (Protease zu Substrat-Verhältnis 1 : 5) für 5 min reichte aus, um weitestgehend die vollständig verdauten PCP-Fragmente von Interesse [TycB<sub>3</sub>-PCP (Gln<sup>1579</sup>–Lys<sup>1595</sup>)] zu erhalten. Ein Vorteil war in diesem speziellen Fall, dass das ausgeschnittene Peptid komplett im *loop*-Bereich zwischen den Helices 1 und 2 des PCPs [Koglin *et al.*, 2006] lag, was die Zugänglichkeit des Trypsins erleichterte. Somit war die Verwendung und Entwicklung alternativer Proteolyseverfahren, wie beispielsweise mit CNBr [McLoughlin & Kelleher, 2004], nicht notwendig. Die bei der anschließenden ESI-FTICR-MS-Analyse gefundenen modifizierten PCP-Fragmente stimmten exakt mit den theoretisch berechneten überein. Hierbei wurde festgestellt, dass eine Sensitivitätssteigerung durch eine weitere chromatographische Trennung der einzelnen Fraktionen vor der hochauflösenden MS-Analyse erzielt wird, da Verunreinigungen nochmals abgetrennt werden. Wie beschrieben [McLoughlin *et al.*, 2005] war die MS-Signalintensität der entsprechenden PCP-Fragmente mit gebundenen Reaktionsintermediaten nach natürlicher Substrataktivierung niedriger. Dennoch konnten alle entsprechenden TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente (Holo, Phe- und Phe-Phe-) gefunden werden. Eine entscheidende Entdeckung, die für die Quantifizierung der einzelnen Fragmente einen großen Nutzen hatte, war das Auftreten eines spezifischen Fragmentierungsmusters bei der MS-MS-Analyse von (TycB<sub>3</sub>-PCP-) Peptiden, die zuvor mit dem Ppant-Arm modifiziert worden waren. Die daraus entwickelte HPLC-ESI-SRM-Methode (s. Abschnitte 4.5.2.5 und 5.3.3) zur Extraktion der Intermediat-Fragmente lieferte eine erneute Sensitivitätssteigerung für eine äußerst exakte Quantifizierung. Der Fehler bei der Intermediatsbestimmung zwischen verschiedenen zu gleichen Reaktionszeitpunkten gemessenen Proben betrug maximal  $\pm 2\%$ , was die Vorteile dieser Methode erneut unterstreicht. Durch die chromatographische Trennbarkeit der L-Phe-L/D-Phe-S-Ppant-TycB<sub>3</sub>-PCP-Fragmente konnte auch die Aktivität der E-Domänen überprüft werden. Mit Hilfe der optimierten Methodik waren eine exakte kinetische Untersuchung der Phe-Phe-Bildung am TycB<sub>3</sub>-PCP der dimodularen TycB<sub>2,3</sub>-Proteine und die Bestimmung von  $k_{\text{obs}}$ -Werten möglich.

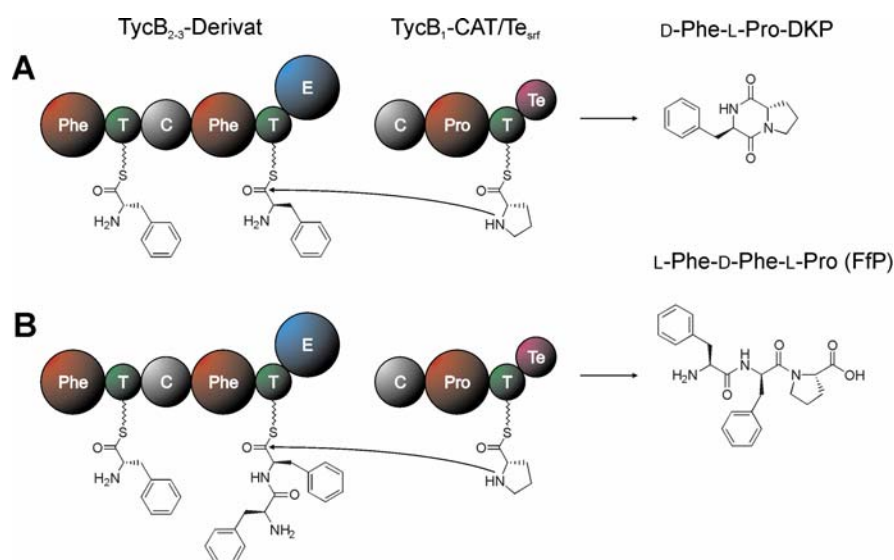
### 6.4.3 Einfluss der E-Domäne auf die Elongation

Zunächst wurde die Auswirkung eines E-Domänen austauschs (Peptidyl- gegen Aminoacyl-) auf die Reaktionen innerhalb der rekombinanten dimodularen Proteine TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE und TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> untersucht. Dabei war interessant, ob die Aminoacyl-E-Domäne die Dipeptidbildung am zweiten PCP beeinträchtigt. Nach natürlicher Substrataktivierung wurde dazu die Reaktion der Dimodule zu verschiedenen Zeitpunkten beendet. Beide E-Domänen waren aktiv, da nach 15 min die zuvor berichteten [Linne & Marahiel, 2000; Stein *et al.*, 2005] L-Phe-L/D-Phe-Verhältnisse im Epimerisierungsgleichgewicht gefunden wurden. Das E-Domänen-Austauschprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> zeigte eine ungefähr dreifach reduzierte Phe-Phe-Bildungsgeschwindigkeit am TycB<sub>3</sub>-PCP im Vergleich zu TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE. Außerdem war die nach 15 min Inkubationszeit ermittelte Menge an gebundenem Dipeptid um die Hälfte gegenüber der entsprechend am Wildtypprotein vorgefundenen erniedrigt. Somit wurde deutlich, dass der E-Domänen austausch einen Einfluss auf die enzymatischen Abläufe ausübt und die Dipeptidbildung an den dimodularen Modellproteinen beeinträchtigt. Die festgestellten Unterschiede im Vergleich zur Reaktion bei Anwesenheit der nativen TycB<sub>3</sub>-E-Domäne sprechen für eine hohe Affinität der TycA-E-Domäne zu dem nach der Initiation der Reaktion entstehenden Phe-S-Ppant-Intermediat am zweiten PCP. Es wäre also denkbar, dass sie mit der hoch selektiven Akzeptor-Tasche der stromaufwärts (*upstream*) gelegenen C-Domäne [Belshaw *et al.*, 1999] um die Bindung des Aminoacyl-S-Ppant-Intermediats konkurriert. Ist die Epimerisierung erfolgt, akzeptiert die C-Domäne das D-Enantiomer nicht mehr zur Kondensation mit dem vorausgehenden Baustein. Möglicherweise resultiert die geringere Menge an gefundenem Dipeptid auch aus einer Blockierung des Phe-S-Ppant in der aktiven Tasche der TycA-E, sobald es epimerisiert worden ist.

### 6.4.4 Einfluss der E-Domäne auf den Transfer von Reaktionsintermediaten

Um die mit Hilfe der direkten Intermediatsbestimmung beobachtete Auswirkung eines E-Domänen Austauschs auf die Dipeptidbildung an den dimodularen Modellsynthetasen im Kontext eines nachfolgenden Transfers von Intermediaten zu testen und möglichst auch zu untermauern, wurde ein Produktbildungsassay zur Untersuchung gewählt. Dazu wurden die drei beschriebenen Dimodule mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>, das wieder für eine schnelle Produktfreisetzung dienen sollte [Schwarzer *et al.*, 2001], als Akzeptorenzym inkubiert. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass dieses Enzym auch transferierte Peptidyl-Intermediate mit

unveränderter Substratspezifität prozessieren kann [s. Abschnitte 5.2 und 6.3; Stein *et al.*, 2005]. Gemäß publizierter Erkenntnisse wurde prinzipiell von einer *in trans* Interaktionsmöglichkeit der Synthetasen TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> und TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> mit dem Akzeptor TycB<sub>1</sub> ausgegangen [Linne *et al.*, 2003; Hahn & Stachelhaus, 2004; 2006]. Das Wildtypprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE hingegen sollte nicht mit TycB<sub>1</sub> kommunizieren können und in dem Assay als Negativkontrolle dienen. Das Produkt, das bei geregelterm Ablauf der enzymatischen Schritte nach Inkubation der Synthetasen mit den nativen Substratamino­säuren zu erwarten wäre, ist das Tripeptid L-Phe-D-Phe-L-Pro. Es sollte durch Bildung des Dipeptids Phe-Phe an den TycB<sub>2-3</sub>-Derivaten gefolgt von einer Epimerisierung und Transfer auf TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> zur Kondensation mit Pro vorgefunden werden. Die Produktfreisetzung geschieht in diesem Fall katalysiert durch die Thioesterase des Akzeptor-Fusionsproteins. Überraschenderweise wurden gerade bei Einsatz des E-Domänen-Austauschproteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> aber auch große Mengen des verkürzten, zyklischen Dipeptidprodukts D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP) detektiert. Dieses Produkt entsteht offensichtlich durch eine Misinitiation am Modul TycB<sub>3</sub>, die den Transfer des Aminoacyl- (Phe-) Intermediats auf TycB<sub>1</sub> zur Folge hat. DKP wird direkt nach erfolgter Kondensation mit Pro unkatalysiert freigesetzt [Stachelhaus *et al.*, 1998]. Dementsprechend wurden bei den Analysen dieses Produktbildungsassays zwei konkurrierende Reaktionswege verfolgt und die jeweils daraus hervorgehenden Produkte detektiert (Abbildung 6-2).



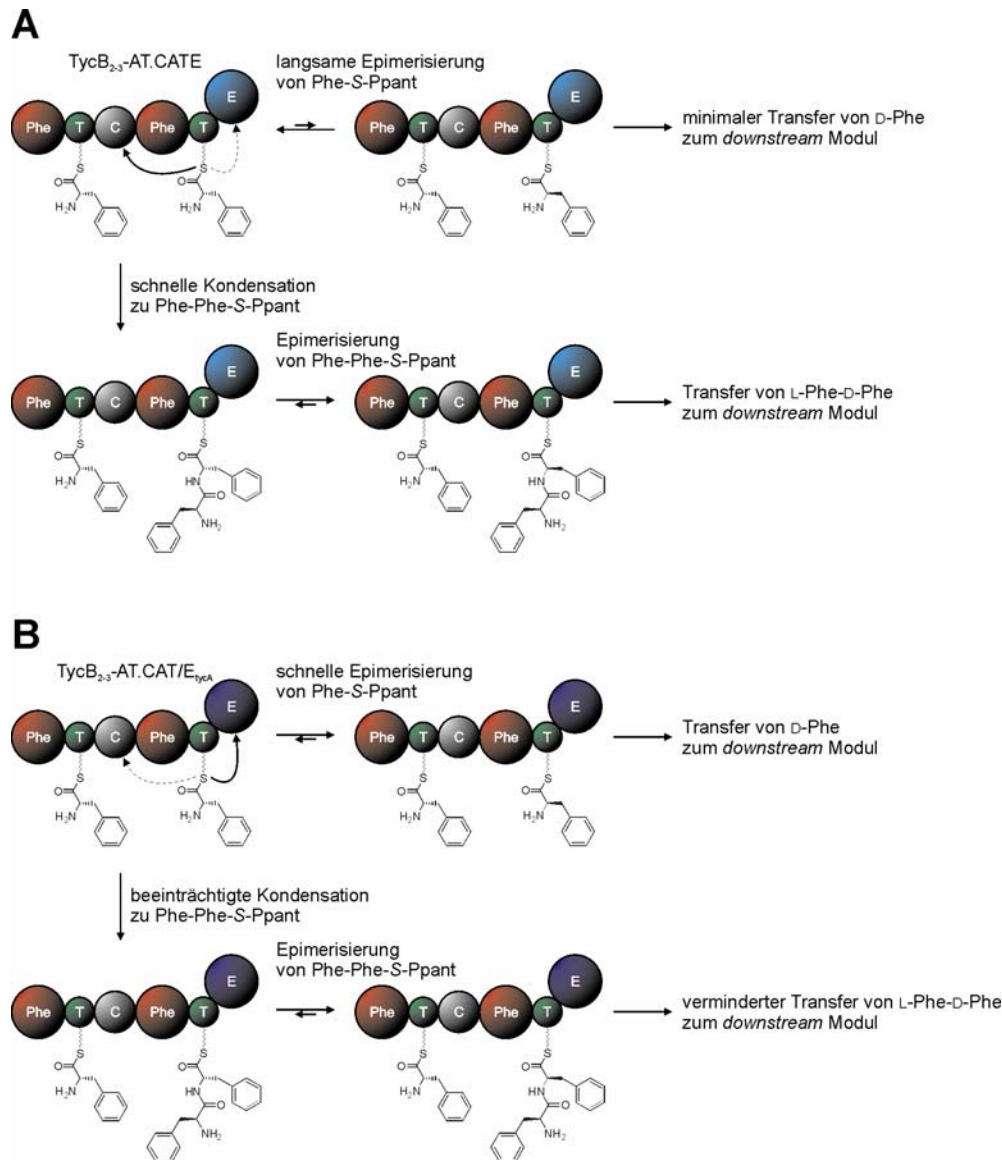
**Abbildung 6-2** Die zwei gefundenen Produktbildungswege bei der Untersuchung der TycB<sub>2-3</sub>-Derivate im Transfer-Assay mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub>. (A) Als Produkt einer Misinitiation am zweiten Modul (TycB<sub>3</sub>) des Donorproteins wurde das unkatalytisch freigesetzte zyklische Dipeptid D-Phe-L-Pro-DKP festgestellt. (B) Der normale, geregelte Verlauf der enzymatischen Reaktionen äußerte sich in der Bildung des zu erwartenden Tripeptids L-Phe-D-Phe-L-Pro (FfP).

Das Wildtypprotein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE stellte sich auch als die bei Inkubation mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> erwartete Negativkontrolle heraus. Lediglich geringe Mengen an DKP wurden vermutlich durch ein unspezifisches Zusammentreffen der im Assay konzentriert eingesetzten Enzyme erzeugt. Die Experimente mit TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> resultierten in einer eindeutig bevorzugten Produktion des erwünschten Tripeptids L-Phe-D-Phe-L-Pro. Dieser Reaktionsweg war sehr spezifisch, da hier praktisch kein DKP erzeugt wurde. Die Interaktion von TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub> mit TycB<sub>1</sub>-CAT/Te<sub>srf</sub> hingegen führte zu einer übermäßigen Bildung des unerwünschten Dipeptidprodukts D-Phe-L-Pro-DKP. Diese Beobachtungen unterstreichen, dass eine Aminoacyl-E-Domäne (hier TycA-E) an C-terminaler Position einer multimodularen Synthetase den geordneten intermodularen Transfer von enzymgebundenen Reaktionsintermediaten auf ein Akzeptorenzym beeinträchtigt und eine unerwünschte Misinitiation hervorruft.

#### 6.4.5 Funtionalitätsvergleich Aminoacyl- versus Peptidyl-E-Domänen

Wie mit Hilfe des in dieser Arbeit ausgewählten dimodularen TycB<sub>2-3</sub>-Modellsystems verfolgt wurde, kann der Austausch einer Peptidyl- gegen eine Aminoacyl-E-Domäne den geordneten Ablauf an nichtribosomalen Peptidsynthetasen ernsthaft beeinflussen. Hier wurde bei Austausch der nativen TycB<sub>3</sub>-E-Domäne gegen die des Initiationsmoduls TycA eine starke Beeinträchtigung (Verminderung) in der Effizienz der (Phe-Phe-) Dipeptidbildung an den TycB<sub>2-3</sub>-Derivaten festgestellt. Dieser Effekt hat wiederum Auswirkungen auf den intermodularen Transfer von enzymgebundenen Reaktionsintermediaten, so dass bei Stellung einer Aminoacyl-E-Domäne in einem Elongationsmodul an dieser Stelle eine Misinitiation der Peptidsynthese hervorgerufen wird. Möglicherweise ist eine ausgesprochen hohe Affinität der TycA-E-Domäne zum Aminoacyl- (Phe-) S-Ppant-Intermediat für diese Auswirkungen verantwortlich. Auf der anderen Seite könnten auch kinetische Gründe für eine Konkurrenz mit der hoch spezifischen Akzeptor-Stelle [Belshaw *et al.*, 1999] der C-Domäne innerhalb des gleichen Moduls (TycB<sub>3</sub>-C) um die Bindung des Aminoacyl-Substrats sprechen. Wie bereits beim Aktivitätsvergleich der E-Domänen (s. Abschnitt 6.2.5) erwähnt, ist der Einbruch in der Aktivität der Peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> bei der Epimerisierung eines Aminoacyl-Substrats recht deutlich (Faktor 2.5) im Vergleich zur Reaktion mit dem kongnaten Peptidyl-Substrat. Die Aminoacyl-E-Domäne von TycA hingegen invertiert Peptidyl-Substrate (z. B. Phe-Phe-S-Ppant: 1.8 min<sup>-1</sup>, ~ 60% D-Isomer) [Stein *et al.*, 2005] mit fast der gleichen Effizienz wie ihr kognates Aminoacyl-Substrat (Phe-S-Ppant: > 2.0 min<sup>-1</sup>, 70% D-Isomer) [Linne *et al.*, 2001]. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem Modellvorschlag, dass die

Epimerisierung eines Aminoacyl- im Vergleich zu der eines Peptidyl-S-Ppant aus elektronischen Gründen herausfordernder ist (s. Abschnitt 6.2.5) [Linne & Marahiel, 2000] und E-Domänen aus Initiationsmodulen für eine effiziente Inversion dieser Intermediate optimiert sind. Somit würde eine schnelle Bindung und Epimerisierung des Aminoacyl-Intermediats, das direkt nach der Initiation der enzymatischen Reaktionen entsteht, zu einer Diskriminierung des gebildeten D-Enantiomers durch die Akzeptor-Tasche der C-Domäne innerhalb des Moduls führen. Dies beeinträchtigt die Dipeptidbildung an den dimodularen Synthetasen und führt bei Produktbildungsassays mit dem Akzeptorprotein TycB<sub>1</sub> zur beobachteten Misinitiation (Abbildung 6-3 B). Die Spezifität der C-Domäne von TycB<sub>1</sub>, die natürlicherweise ein Phe-Intermediat von TycA übernimmt, scheint in diesem Zusammenhang abgesehen von ihrer Selektion der D-Form keinen großen Einfluss auf die Produktbildung zu haben, da mit dem Donor-Protein TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE/COM<sub>tycA</sub> fast ausschließlich das gewünschte Produkt gebildet wurde. Hier scheint die generell niedrigere Aktivität der Peptidyl-E-Domäne von TycB<sub>3</sub> gegenüber Aminoacyl-S-Ppant-Substraten sicherzustellen, dass das aktivierte und als Thioester gebundene Phe zur Akzeptor-Stelle der *upstream* gelegenen C-Domäne (TycB<sub>3</sub>-C) dirigiert wird. So kann die Kondensation zum Dipeptid stattfinden, bevor die katalytische Epimerisierung und der Transfer zum nachfolgenden *downstream* Modul ablaufen (Abbildung 6-3 A). Eine Rolle für die Regulierung von Kondensation und Epimerisierung innerhalb eines Elongationsmoduls wurde bereits früher diskutiert [Linne & Marahiel, 2000; Luo *et al.*, 2001]. Da bekannt ist, dass die C-Domäne des nachfolgenden Moduls an ihrer elektrophilen Donor-Bindungstasche nicht die Länge des eintreffenden Substrats diskriminiert [Linne *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2005], wird die regulierende Funktion einer Peptidyl-E-Domäne durch die hier gezeigten Ergebnisse noch stärker in den Vordergrund gerufen. Diese Eigenschaft ist entscheidend an der Kontrolle zum Transfer korrekter Intermediate bei der nichtribosomalen Peptidsynthese mit Modifikationen durch E-Domänen beteiligt. Basierend auf der Charakterisierung funktioneller Unterschiede, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt worden ist, kann zudem die Verwendung der Begriffe Aminoacyl- und Peptidyl-E-Domäne für E-Domänen aus Initiations- bzw. Elongationsmodulen bekräftigt werden. Es wird deutlich, dass eine Aminoacyl- eine Peptidyl-E-Domäne in ihrer Funktion nicht ersetzen kann.



**Abbildung 6-3** Modelldarstellung zur Illustration des Effekts der E-Domänen Funktionalität auf den intermodularen Transfer von Reaktionsintermediaten. Die Pfeile am TycB<sub>3</sub>-PCP-gebundenen Phe-S-Ppant sollen die vorgeschlagenen Bewegungen zu den katalytischen Zentren andeuten (gestrichelte Linie für die weniger bevorzugte und dicke Linie für die bevorzugte Richtung). (A) Beim Wildtypenzym TycB<sub>2-3</sub>-AT.CATE sorgt die niedrigere Aktivität der TycB<sub>3</sub>-E-Domäne für einen geordneten Ablauf von Dipeptidbildung, Epimerisierung und Transfer zum folgenden *downstream* Modul. (B) Der Austausch einer Peptidyl- gegen eine Aminoacyl-E-Domäne (hier schematisch gezeigt in Form des dimodularen Proteins TycB<sub>2-3</sub>-AT.CAT/E<sub>tycA</sub>) ruft eine Konkurrenz zwischen C- und E-Domäne um die Bindung des Phe-S-Ppant hervor. Aus der schnellen Epimerisierung des Aminoacyl-Intermediats resultiert eine hohe Rate an Misinitiation.

## 6.5 Biokombinatorik mit NRPS unter Beteiligung von E-Domänen

Die Biosynthese einer großen Anzahl von pharmakologisch interessanten und ungewöhnlich modifizierten Peptiden wird durch NRPS katalysiert [Walsh, 2002; Finking & Marahiel, 2004;



Sieber & Marahiel, 2005]. Durch die Entdeckung neuer Produkte und Systeme [Lautru *et al.*, 2005] wächst diese Zahl stetig an. Obwohl viele dieser Multienzymkomplexe schon nativ auftretende, interessante alternative Reaktionswege vorstellen, um zu chemischer Diversifizierung synthetisierter Produkte zu gelangen [Wenzel *et al.*, 2006], beherbergen sie einen großen Nutzen für die Herstellung neuer, bioaktiver Substanzen. Beispielsweise kann eine Kombination aus Mutation eines NRPS-Systems mit anschließender Fütterung der Produzentenstämme mit alternativen Bausteinen – ein Ansatz, der als Mutationsbiosynthese oder Mutasyntese bezeichnet wird [Weist & Süssmuth, 2005] – zur Veränderung bioaktiver Strukturen ausgenutzt werden. Aufgrund ihrer multimodularen Anordnung sind NRPS aber besonders für einen weiteren Ansatz – der kombinatorischen Biosynthese – von Interesse. Daher wurde auch bereits großer Aufwand betrieben, um Daten zu Substratspezifität und Grenzen von Domänen und Modulen zu sammeln [Dökel & Marahiel, 2000]. Diese Erkenntnisse zusammen mit der Erlangung struktureller Informationen – beispielsweise zu A- [Conti *et al.*, 1997], PCP- [Koglin *et al.*, 2006] und Te-Domänen [Bruner *et al.*, 2002] – machten es möglich, Regeln für die Um- und Neugestaltung von NRPS zu entwickeln [Linne & Marahiel, 2004]. Während frühere Versuche zu Domänen- oder Modulaustauschen noch komplett unerfolgreich waren oder in geringen Produktausbeuten resultierten [Stachelhaus *et al.*, 1995], wurden in jüngster Zeit vielversprechende Studien zur Generierung durch Modulfusionen publiziert. So wurde beschrieben, dass es möglich ist, ganze CAT- oder TCA-Module zu versetzen [Dökel & Marahiel, 2000; Mootz *et al.*, 2002]. Ferner wurde über die spezifische Deletion eines Moduls *in vivo* berichtet [Mootz *et al.*, 2002a].

In diesem Zusammenhang wurden auch E-Domänen, die die am häufigsten in NRPS optional vorgefundenen modifizierenden Domänen sind, in umfangreichen Studien untersucht, wodurch auch bekannt war, dass sie nur in Kontakt mit einem PCP<sup>E</sup> aktiv sind [Stachelhaus & Walsh, 2000; Linne *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2005]. Zudem sind E-Domänen speziell in bakteriellen Systemen am C-terminalen Ende von Synthetasen vorzufinden (externe E-Domänen), wo sie in die Kommunikation *in trans* mit dem nachfolgenden Enzym involviert sind [Linne *et al.*, 2003]. Für diesen Einfluss konnten kürzlich die Kommunikation vermittelnden (COM-) Domänen am Ende der E-Domänensequenz ausfindig gemacht werden [Hahn & Stachelhaus, 2004; 2006]. Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Informationen zur breiten Substrattoleranz und Funktionalität von E-Domänen leisten einen zusätzlichen Beitrag zum Verständnis, wie NRPS für Modulfusionen *in vivo* unter Einbeziehung von E-Domänen ausgenutzt werden können, um gewünschte neuartige Produkte zu erhalten. Sollen also Fusionsenzyme durch N-terminale Verlängerung eines Initiationsmoduls erzeugt werden,

muss der entsprechende C-Terminus der generierten hybriden Synthetase eine Peptidyl-E-Domäne enthalten. Diese muss wiederum über die Fusion mit einer geeigneten COM-Domäne zur Interaktion mit dem nachfolgenden Modul *in trans* befähigt werden. Dennoch gilt es auch in Zukunft, Arbeit in die Aufklärung dieser interessanten Multienzyme und ihrer außergewöhnlichen modifizierenden Domänen zu investieren, um ihr hohes Potential für die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Biokombinatorik voll ausschöpfen zu können.

## 7 Anhang

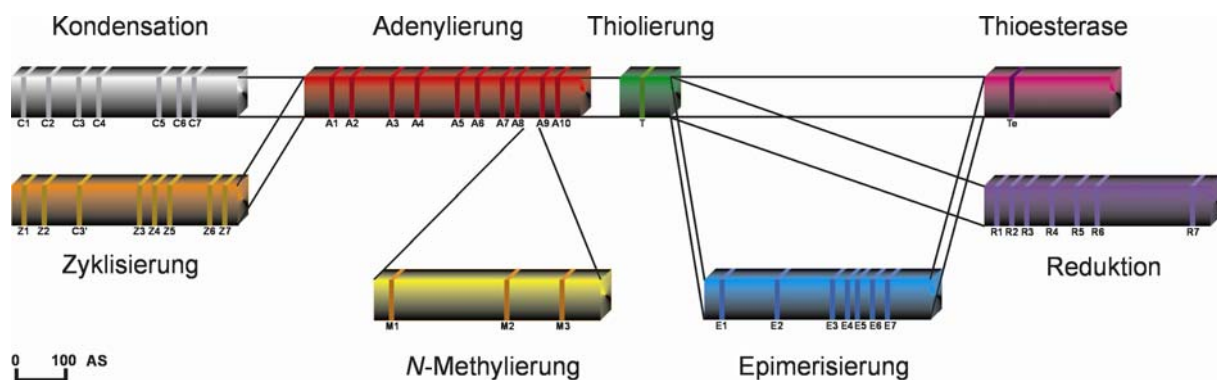
### 7.1 Konservierte *core*-Motive von NRPS-Domänen

Die hoch konservierten *core*-Motive (Tabelle 7-1 und Abbildung 7-1) in der Aminosäuresequenz sind charakteristisch für identische Typen von NRPS-Domänen und erlauben deren Zuordnung [Stachelhaus *et al.*, 1995a; Marahiel *et al.*, 1997; Konz & Marahiel, 1999]. Bei den meisten Domänen nehmen spezifische Reste dieser *core*-Motive eine entscheidende Rolle für die Katalyse ein.

**Tabelle 7-1** Bezeichnungen und Aminosäuresequenzen der *core*-Motive von NRPS-Domänen

Domäne	Motiv	Sequenz
A-Domäne	A1	L(TS)YxEL
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6	GELxIxGxG(VL)ARGYL
	A7	Y(RK)TGDL
	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPLPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
T-Domäne	T	DxFFxxLGG(HD)S(LI)
C-Domäne	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)xR
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RDxSRNPL
Te-Domäne	Te	G(HY)SxG
E-Domäne	E1	PIQxWF
	E2	HHxISDG(WV)S
	E3	DxLLxAxG
	E4	EGHGRE
	E5	RTVGWFTxxYP(YV)PF

	E6	PxxGxGYG
	E7	FNYLG(QR)
M-Domäne	M1	VL(DE)GxGxG
	M2	NELStYRYxAV
	M3	VEsSxARQxGxLD
Cy-Domäne	Z1	FPL(TS)xxQxAYxxGR
	Z2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	C3'	(DNR)4xDxxS
	Z3	(LI)Pxx(PAL)x(LPF)P
	Z4	(TS)(PA)xxx(LAF)6x(IVT)LxxW
	Z5	(GA)(DQN)FT
	Z6	P(IV)VF(TA)SxL
	Z7	QVx(LI)Dx(QH)11xW(DYF)
Ox-Domäne	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VG
	Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
R-Domäne	R1	V(LF)(LV)TG(AV)(TN)G(YF)LG
	R2	VxxxVRA
	R3	GDL
	R4	VYPYxxLRx(PL)NVxxT
	R5	GYxxSKWxxE
	R6	RPG
	R7	LExx(VI)GFLxxP



**Abbildung 7-1** NRPS-Domänen. Die schematische Abbildung zeigt die bedeutensten Domänen von Peptidsynthetasen, wobei intermodulare Stellung und relative Größe berücksichtigt wurden. Bereiche der hoch konservierten *core*-Motive sind farblich hervorgehoben.

## 8 Literatur

- Aharonovitz, Y., Bergmeyer, J., Cantoral, J. M., Cohen, G., Demain, A. L., Fink, U., Kinghorn, J., Kleinkauf, H., MacCabe, A., Palissa, H., *et al.* (1993) Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, the multienzyme integrative the four primary reactions in beta-lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase, *Biotechnology (N Y)* **11**, 807–810
- Ahn, J. H. & Walton, J. D. (1997) A fatty acid synthase gene in *Cochliobolus carbonum* required for production of HC-toxin, cyclo(D-prolyl-L-Alanyl-D-Alanyl-L-2-amino-9,10-epoxi-8-oxodecanoyl), *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 207–214
- Aron, Z. D., Dorrestein, P. C., Blackhall, J. R., Kelleher, N. L. & Walsh, C. T. (2005) Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the Mycosubtilin gene cluster, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14986–14987
- Balibar, C. J., Vaillancourt, F. H. & Walsh, C. T. (2005) Generation of D amino acid residues in assembly of Arthrofactin by dual condensation/epimerization domains, *Chem. Biol.* **12**, 1189–1200
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523
- Belshaw, P. J., Walsh, C. T. & Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis, *Science* **284**, 486–489
- Bennett, J. & Scott, K. J. (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue, *Anal. Biochem.* **43**, 173–182
- Bergendahl, V., Linne, U. & Marahiel, M. A. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis, *Eur. J. Biochem.* **269**, 620–629
- Blasiak, L. C., Vaillancourt, F. H., Walsh, C. T. & Drennan, C. L. (2006) Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis, *Nature* **440**, 368–371
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities using the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248–245
- Brown, T. A. (1991) *Molekular Biology, Labfax*, BIOS Scientific Publishers limited, Manchester, UK
- Brückner, R. (1996) *Reaktionsmechanismen*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

- Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Stubbs, M. T.** (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE, *Structure* **10**, 301–310
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M. T. & Dobberstein, B.** (1987) A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*, *Methods Enzymol.* **155**, 416–433
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with beta-galactosidase selection, *Biotechniques* **5**, 376–379
- Buschiazzo, A., Goytia, M., Schaeffer, F., Degrave, W., Shepard, W., Gregoire, C., Chamond, N., Cosson, A., Bernemann, A., Coatnoan, N., Alzari, P. M. & Minoprio, P.** (2006) Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1705–1710
- Byford, M. F., Baldwin, J. E., Shiau, C. Y. & Schofield, C. J.** (1997) The mechanism of ACV-Synthetase, *Chem. Rev.* **97**, 2631–2650
- Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C.** (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations, *Science* **282**, 63–68
- Cane, D. E. & Walsh, C. T.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem. Biol.* **6**, R319–325
- Chan, W.C. & White P. D.** (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, ed. B.D. Hames., Oxford: Oxford University Press.
- Cheng, Y. Q. & Walton, J. D.** (2000) A eucaryotic alanine racemase gene involved in cyclic peptide biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **275**, 4906–4911
- Cirilli, M., Zheng, R., Scapin, G. & Blanchard, J. S.** (1998) Structural symmetry: the three-dimensional structure of *Haemophilus influenzae* diaminopimelate epimerase, *Biochemistry* **37**, 16452–16458
- Clugston, S. L., Sieber S. A., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T.** (2003) Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: The C<sub>5</sub> domain of tyrocidine synthetase is a <sup>3</sup>C<sub>L</sub> catalyst, *Biochemistry* **42**, 12095–12104
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P.** (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S, *EMBO J.* **16**, 4174–4183

- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. & van Sinderen, D.** (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.* **8**, 821–831
- de Crécy-Lagard, V., Marlière, P. & Saurin, W.** (1995) Multienzymatic non-ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerization, *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 927 – 936
- de Crécy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. & Blanc, V.** (1997) Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene, *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1904–1909
- Dieckmann, R., Lee, Y. O., Liempt, H. van, Döhren, H. von & Kleinkauf, H.** (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases, *FEBS Lett.* **357**, 212–216
- Dökel, S. & Marahiel, M. A.** (2000) Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases, *Chem. Biol.* **7**, 373–384
- Du, L., Chen, M., Sanchez, C. & Shen, B.** (2000) An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalysing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumour drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003, *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 171–175
- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Müller, R. & Marahiel, M. A.** (2004) Rational design of bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis, *Chem. Biol.* **11**, 261–271
- Ehmann, D. E., Gehring, A. M. & Walsh, C. T.** (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5, *Biochemistry* **38**, 6171–6177
- Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C. & Walsh, C. T.** (2000) The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2509–2514
- Ehmann, D. E., Trauger, J. W., Stachelhaus, T. & Walsh, C. T.** (2000) Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases, *Chem. Biol.* **7**, 765–772

- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics, *Biochemistry* **41**, 9718–9726
- Farabaugh, P. J.** (1978) Sequence of the *lac* I gene, *Nature* **274**, 765
- Faulkner, D. J.** (2002) Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* **19**, 1–48
- Fernandez-Lopez, S., Kim, H. S., Choi, E. C., Delgado, M., Granja, J. R., Khasanov, A., Kraehenbuehl, K., Long, G., Weinberger, D. A., Wilcoxen, K. M. & Ghadiri, M. R.** (2001) Antibacterial agents based on the cyclic D,L- $\alpha$ -peptide architecture, *Nature* **412**, 452–455
- Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides, *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 453–488
- Fischer, L. M., Belasco, J. G., Bruice, T. W., Albery, W. J. & Knowles, J. R.** (1986) Energetics of proline racemase: transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps, *Biochemistry* **25**, 2543 – 2551
- Fleming, A.** (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Brit. J. Exp. Path.* **10**, 226 – 236
- Galakatos, N. G. & Walsh, C. T.** (1987) Specific proteolysis of native alanine racemases from *Salmonella typhimurium*: identification of the cleavage site and characterization of the clipped two-domain proteins, *Biochemistry* **26**, 8475–8480
- Gallo, K. A., Tanner, M. E. & Knowles, J. R.** (1993) Mechanism of the reaction catalysed by glutamate racemase, *Biochemistry* **32**, 3991–3997
- Galonić, D. P., Vaillancourt, F. H. & Walsh, C. T.** (2006) Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3900–3901
- Gentz, R. & Bujard, H.** (1985) Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5, *J. Bacteriol.* **164**, 70–77
- Gill, S. C. & Hippel, P. H. von** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* **182**, 319–326
- Glavas, S. & Tanner, M. E.** (2001) Active site residues of glutamate racemase, *Biochemistry* **40**, 6199–62048
- Gold, H. S. & Moellering, R. C.** (1996) Antimicrobial drug-resistance, *N. Engl. J. Med.* **335**, 1445–1453



- Gottesman, S., Halpern, E. & Trisler, P.** (1981) Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K12, *J. Bacteriol.* **148**, 265–273
- Gräfe, U.** (1992) *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York
- Grünewald, J., Sieber, S. A., Mahler, C., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2004) Synthesis and Derivatization of Daptomycin: A chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 17025–17031
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. & Grandi, G.** (1998) Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between procaryotic and eucaryotic peptide synthetases, *J. Biol. Chem.* **273**, 32857–32863
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R.** (1993) Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing *N*-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*, *Mol. Microbiol.* **7**, 905–914
- Hahn, J. & Dubnau, D.** (1991) Growth stage signal transduction and the requirements for *srfA* induction in development of competence, *J. Bacteriol.* **173**, 7275–7282
- Hahn, M. & Stachelhaus, T.** (2004) Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15585–15590
- Hahn, M. & Stachelhaus, T.** (2006) Harnessing the potential of communication-mediating domains for the biocombinatorial synthesis of nonribosomal peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 275–280
- Hicks, L. M., O'Connor, S. E., Mazur, M. T., Walsh, C. T. & Kelleher, N. L.** (2004) Mass spectrometric interrogation of thioester-bound intermediates in the initial stages of epothilone biosynthesis, *Chem. Biol.* **11**, 327–335
- Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A.** (1987) New metal chelat absorbents selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *J. Chromatography* **411**, 177–184
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel chelat absorbent, *Bio/Technology* **11**, 1321–1325
- Hochuli, E.** (1989) Aufarbeitung von Bioproteinen: Elegant und wirtschaftlich, *Chemische Industrie* **12**, 69–70

- Hoffmann, K., Schneider-Scherzer, E., Kleinkauf, H. & Zocher, R.** (1994) Purification and characterization of eucaryotic alanine racemase acting as key enzyme in cyclosporin biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **296**, 12710–12714
- Hubbart, B. K. & Walsh, C. T.** (2003) Vancomycin assembly: nature's way, *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 730–765
- Keating, T. A., Marshall, C. G. & Walsh, C. T.** (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH, *Biochemistry* **39**, 15522–15530
- Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T. & Keating, A. E.** (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains, *Nature Structural Biology* **9**, 1–5
- Kelly, W. L., Hillson, N. J. & Walsh, C. T.** (2005) Exision of the epothilone synthetase B cyclization domain and demonstration of in trans condensation/cyclodehydration activity, *Biochemistry* **44**, 13385–13393
- Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2004) The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains, *J. Biol. Chem.* **279**, 7413–7419
- Koglin, A., Mofid, M. R., Löhr, F., Schäfer, B., Rogov, V. V., Blum, M.-M., Mittag, T., Marahiel, M. A., Bernhard, F. & Dötsch, V.** (2006) Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases, *Science* **312**, 273–276
- Kohli, R. M., Trauger, J. W., Schwarzer, D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T.** (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases, *Biochemistry* **40**, 7099–7108
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K. & Marahiel, M. A.** (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthases, *Chem. Biol.* **4**, 927–937
- Konz, D., Doekel, S. & Marahiel, M. A.** (1999) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin, *J. Bacteriol.* **181**, 3443–3450
- Konz, D. & Marahiel, M. A.** (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity?, *Chem. Biol.* **6**, R39–48
- La Clair, J. J., Foley, T. L., Schegg, T. R., Regan, C. M. & Burkart, M. D.** (2004) Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis, *Chem. Biol.* **11**, 195–201

- Laemmli, K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature* **227**, 491–493
- Lai, J. R., Fischbach, M. A., Liu, D. R. & Walsh, C. T.** (2006) A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5314–5319
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T.** (1996) A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferases, *Chem. Biol.* **3**, 923–936
- Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M. & Challis, G. L.** (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining, *Nat. Chem. Biol.* **1**, 265–269
- Lin, T.-P., Chen, C.-L., Chang, L.-K., Tschén, J. S.-M. & Liu, S.-T.** (1999) Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol* **181**, 5060–5067
- Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization, *Biochemistry* **39**, 10439–10447
- Linne, U., Doekel, S. & Marahiel, M. A.** (2001) Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases, *Biochemistry* **40**, 15824–15834
- Linne, U.** (2001) Epimerisierungsdomänen aus Peptidsynthetasen – Untersuchungen zur Substratspezifität und zur Interaktion mit anderen Domänen, *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*
- Linne, U., Stein, D. B., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (2003) Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template, *Biochemistry* **42**, 5114–5124
- Linne, U., Schwarzer, D., Schroeder, G. N. & Marahiel, M. A.** (2004) Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis, *Eur. J. Biochem.* **271**, 1536–1545
- Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2004) Reactions catalyzed by mature and recombinant nonribosomal peptide synthetases. *Methods Enzymol.* **388**, 293–315
- Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H. & Roskoski, R. Jr.** (1971) Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **35**, 1–34

- Luo, L. & Walsh, C. T.** (2001) Kinetic analysis of three activated phenylalanyl intermediates generated by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase, *Biochemistry* **40**, 5329–5337
- Luo, L., Burkhardt, M. D., Stachelhaus, T. & Walsh, C. T.** (2001) Substrate recognition and selection by the initiation module PheATE of Gramicidin S synthetase, *J. Am. Soc.* **123**, 11208–11218
- Luo, L., Kohli, R. M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T.** (2002) Timing of epimerization and condensation in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B, *Biochemistry* **41**, 9184–9196
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D.** (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis, *Chem. Rev.* **97**, 2651–2673
- Marshall, C. G., Hillson, N. J. & Walsh, C. T.** (2002) Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF, *Biochemistry* **41**, 244–250
- May, J. J., Wendrich, T. M. & Marahiel, M. A.** (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin, *J. Biol. Chem.* **276**, 7209–7217
- May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A. & Stubbs, M. T.** (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12120–12125
- McLoughlin, S. M. & Kelleher, N. L.** (2004) Kinetic and regiospecific interrogation of covalent intermediates in the nonribosomal peptide synthesis of yersiniabactin, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13265–13275
- McLoughlin, S. M., Mazur, M. T., Miller, L. M., Yin, J., Liu, F., Walsh, C. T. & Kelleher, N. L.** (2005) Chemoenzymatic approaches for streamlined detection of active site modifications on thiotemplate assembly lines using mass spectrometry, *Biochemistry* **44**, 14159–14169
- Miao, V., Coeffet-Legal, M. F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C. J., Wrigley, S. K., & Baltz, R. H.** (2005) Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry, *Microbiology* **151**, 1507–1523
- Miller, D. A. & Walsh, C. T.** (2001) Yersiniabactin synthetase: probing the recognition of carrier protein domains by the catalytic heterocyclization domains, Cy1 and Cy2, in the chain-initiating HWMP2 subunit, *Biochemistry* **40**, 5313–5321

- Miller, D. A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T. A. & Walsh, C. T.** (2002) Yersiniabactin synthetase. A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*, *Chem. Biol.* **9**, 333–344
- Mofid, M. R., Marahiel, M. A., Ficner, R., & Reuter, K.** (1999) Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases, *Acta. Crystallogr. D* **55**, 1098–1100
- Mofid, M. R., Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2002) Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetases modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp, *J. Biol. Chem.* **277**, 17023–17031
- Mofid, M. R., Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2004) Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferase Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism, *Biochemistry* **43**, 4128–4136
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (1997) Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 543–551
- Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (1997a) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: Complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains, *J. Bacteriol* **179**, 6843–6850
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases, *ChemBioChem* **3**, 490–504
- Mootz, H. D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2002a) Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10980–10981
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction, *Meth. Enzymol.* **155**, 335–350
- Patel, H. M. & Walsh, C. T.** (2001) *In vitro* reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and *N*-methyltransferase activities, *Biochemistry* **40**, 9023–9031
- Patel, H. M., Tao, J. & Walsh, C. T.** (2003) Epimerization of an L-cysteinyll to a D-cysteinyll residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry* **42**, 10514–10527
- Pfeifer, E., Pavela-Vranic, M., von Döhren, H. & Kleinkauf, H.** (1995) Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis, *Biochemistry* **34**, 7450–7459

- Pfennig, F., Schauwecker, F. & Keller, U.** (1999) Molecular characterization of the genes of actinomycin synthetase I and of a 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid carrier protein involved in the assembly of the acylpeptide chain of actinomycin in *Streptomyces*, *J. Biol. Chem.* **274**, 12508–12516
- Pillai, B., Cherney, M. M., Diaper, C. M., Sutherland, A., Blanchard, J. S., Vederas, J. C. & James, M. N. G.** (2006) Structural insights into stereochemical inversion by diaminopimelate epimerase: an antibacterial drug target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8668–8673
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. & Wallach, J.** (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 553–563
- Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. & Walsh, C. T.** (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases, *Biochemistry* **37**, 1585–1595
- Reimann, C., Patel, H. M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C. T. & Haas, D.** (2001) Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* **183**, 813–820
- Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A. & Ficner, R.** (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily, *EMBO J.* **18**, 6823–6831
- Richard, J. P. & Amyes, T. L.** (2001) Proton transfer at carbon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 626–633
- Richard, J. P. & Amyes, T. L.** (2004) On the importance of being zwitterionic: enzymatic catalysis of decarboxylation and deprotonation of cationic carbon, *Bioorg. Chem.* **32**, 354–366
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K.** (2000) Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90, *Mol. Microbiol.* **37**, 156–167
- Ruzheinikov, S. N., Taal, M. A., Sedelnikova, S. E., Baker, P. J. & Rice, D. W.** (2005) Substrate-induced conformational changes in *Bacillus subtilis* glutamate racemase and their implications for drug discovery, *Structure (London)* **13**, 1707–1713
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. & Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostics of cell anemia, *Science* **230**, 1350

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger, F., Miklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Schröder, W. & Keller, U.** (1998) Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II, *J. Bacteriol.* **180**, 2468–2474
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U.** (2000) Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of *N*-methylated acyl peptides, *Chem. Biol.* **7**, 287–297
- Schmidt, F. R.** (2004) The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 335–343
- Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in nonribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*, *Arch. Microbiol.* **169**, 404–410
- Schneider, T. L., Shen, B. & Walsh, C. T.** (2003) Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation, *Biochemistry* **42**, 9722–9730
- Schoenafinger, G., Schracke, N., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2006) Formylation domain: an essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7406–7407
- Schracke, N., Linne, U., Mahlert, C. & Marahiel, M. A.** (2005) Synthesis of linear gramicidin requires the cooperation of two independent reductases, *Biochemistry* **44**, 8507–8513
- Schwarz, E., Scherrer, G., Hobom, G. & Kössel, H.** (1987) Nucleotide sequence of *cro*, *cII* and part of the *O* gene in phage lambda DNA, *Nature* **272**, 410–414
- Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly, *Naturwissenschaften* **88**, 93–101
- Schwarzer, D., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (2001) Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases, *Chemistry & Biology* **132**, 1–14

- Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases, *PNAS* vol. **99** no. **22**, 14083–14088
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Pocard, J. A. & Walton, J. D.** (1992) The cyclic peptide synthetase catalysing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame, *J. Biol. Chem.* **267**, 26044–26049
- Shaw-Reid, C. A., Kelleher, N. L., Losey, H. C., Gehring, A. M., Berg, C. & Walsh, C. T.** (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* Ent F catalyses both elongation and cyclolactonization, *Chem. Biol.* **6**, 385–400
- Sieber, S. A., Walsh, C. T. & Marahiel, M. A.** (2003) Loading Peptidyl-Coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10862–10866
- Sieber, S. A., Tao, J., Walsh, C. T. & Marahiel, M. A.** (2004) Peptidyl thiophenols as substrates for nonribosomal peptide cyclases, *Angew. Chem.* **43**, 493–498
- Sieber, S. A. & Marahiel, M. A.** (2005) Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics, *Chem. Rev.* **105**, 715–738
- Smith, D. J., Earl, A. J. & Turner, G.** (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases, *EMBO J.* **9**, 2743–2750
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (1995) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis, *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3–14
- Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A.** (1995a) Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA, *J. Biol. Chem.* **270**, 6163–6169
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1995) Rational design of novel peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains, *Science* **269**, 69–72
- Stachelhaus, T., Hüser, A. & Marahiel, M. A.** (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases, *Chem. Biol.* **3**, 913–921



- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V. & Marahiel, M. A.** (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis: catalytic role of the condensation domain, *J. Biol. Chem.* **273**, 22773–22781
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases, *Chem. Biol.* **6**, 493–505
- Stachelhaus, T. & Walsh, C. T.** (2000) Mutational analysis of the epimerisation domain in the initiation module PheATE of Gramicidin S synthetase, *Biochemistry* **39**, 5775–5787
- Stein, T., Kluge, B., Vater, J., Franke, P., Otto, A. & Wittmann-Liebold, B.** (1995) Gramicidin S synthetase 1 (phenylalanine racemase), a prototype of amino acid racemases containing the cofactor 4'-phosphopantetheine, *Biochemistry* **34**, 4633–4642
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H. R.** (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates, *J. Biol. Chem.* **271**, 15428–15435
- Stein, D. B., Linne, U. & Marahiel, M. A.** (2005) Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases, *FEBS J.* **272**, 4506–4520
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. & Vater, J.** (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and a1/3, *Chem. Biol.* **6**, 31–41
- Steller, S. & Vater, J.** (2000) Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **737**, 267–275
- Stindl, A. & Keller, U.** (1994) Epimerisation of the D-valine portion in the biosynthesis of actinomycin D, *Biochemistry* **33**, 9358–9364
- Styer, L.** (1999) *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Stüber, D., Bannwarth, W., Pink, J. R., Meloen, R. H., Matile, H.** (1990) New B-cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein, *Eur. J. Immunol.* **20**, 819 – 824
- Stüber, D., Matile, H. & Garotta, G.** (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis, *Immunological Methods*, Leftkovits, I., Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, NY (USA), 121–152
- Suo, Z., Tseng, C. C. & Walsh, C. T.** (2001) Purification, priming and catalytic acylation of carrier protein domains in the polyketide synthase and nonribosomal peptidyl synthetase

- modules of the HMWP1 subunit of yersiniabactin synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 99–104
- Sutcliffe, J. G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, 77–90
- Tanner, M. E.** (2001) Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization, *Acc. Chem. Res.* **35**, 237–246
- Tosato, V., Albertini, A. M., Zotti, M., Sonda, S. & Bruschi, C. V.** (1997) Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in *Bacillus subtilis* 168, *Microbiology* **143**, 3443–3450
- Trauger, J. W., Kohli, R. M., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. & Walsh C. T.** (2000) Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase, *Nature* **407**, 215–218
- Tseng, C. C., Bruner, S. D., Kohli, R. M., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Sieber, S. A.** (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase, *Biochemistry* **41**, 13350–13359
- Vater, J., Schlumbohm, W., Sanikow, J., Irrgang, K. D., Miklus, M., Choli, T. & Kleinkauf, H.** (1989) Proteinchemical and kinetic features of gramicidin S synthetase, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**, 1013–1018
- Vogelstein, B. & Gillespie, D.** (1979) Preperative and analytical purification of DNA from agarose, *Prog. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615–619
- Walsh, C.** (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature* **406**, 775–781
- Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbart, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A. & Patel, H. M.** (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 525–534
- Walsh, C. T.** (2002) Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity and Versatility, *Science* **303**, 1805–1810
- Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E.** (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame, *Curr. Genet.* **26**, 120–125
- Weber, T., Bamgartner R., Renner, C., Marahiel, M. A., Holak, T. A.** (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier of modular peptide synthetases, *Struct. Fold. Des.* **8**, 407–418

- Weinreb, P. H., Quadri, L. E., Walsh, C. T. & Zuber, P. (1998) Stoichiometry and specificity of *in vitro* phosphopantetheinylation and aminoacylation of the valine-activating module of surfactin synthetase, *Biochemistry* **37**, 1575–1584
- Weist, S. & Süssmuth, R. D. (2005) Mutational biosynthesis – a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 141–150
- Wenzel, S. C., Meiser, P., Binz, T. M., Mahmud, T. & Müller, R. (2006) Nonribosomal peptide biosynthesis: point mutations and module skipping lead to chemical diversity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2296–2301
- Yeh, E., Kohli, R. M., Bruner, S. D. & Walsh, C. T. (2004) Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated, *ChemBioChem* **5**, 1290–1293
- Yin, J., Straight, P. D., McLoughlin, S. M., Zhou, Z., Lin, A. J., Golan, D. E., Kelleher, N. L., Kolter, R. & Walsh, C. T. (2005) Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15815–15820
- Yoshimura, T. & Esaki, N. (2003) Amino acid racemases: functions and mechanisms, *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 103–109
- Zamenhof, P. J. & Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*, *J. Bacteriol.* **110**, 171–178



## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. M. A. Marahiel für die Möglichkeit zur Bearbeitung einer interessanten Aufgabenstellung sowie für seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. A. Geyer danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Marahiel für die Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre auch außerhalb des Laboralltags. Ganz besonders danke ich Dr. Uwe Linne für seine ständige Leistung von Beiträgen speziell bei der Entwicklung bioanalytischer Strategien, für wertvolle Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Auch Dr. Martin Hahn danke ich für die nette Kooperation und *Kommunikation*. Für die Hilfe bei der Peptidsynthese danke ich Dr. Jan Grünewald und Christoph Mahlert.

Meinen Vertiefungsstudenten Nina Geib, Simon Reitz, Miriam Lauz und Matthias Strieker danke ich für ihre helfenden Hände bei der Laborpraxis.

Ich danke all meinen Freunden für die gemeinsame Gestaltung von Zeiten des Ausgleichs insbesondere während schwieriger Phasen in den letzten Jahren.

Den größten Dank richte ich an meine Familie. Ohne den seelischen Beistand und die Unterstützung durch meine Eltern wäre der Gang meines Bildungswegs so nicht möglich gewesen. Meiner Frau 元皓 (Yuan-Hao) danke ich dafür, dass sie mich so manches Wochenende auf die Lahnberge begleitet hat, und vor allem für den Rückhalt zu Hause trotz eigener Probleme. Diesen wichtigen Menschen widme ich meine Arbeit.